

08.10.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 4 月 2 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 1 2 9 4 3 1
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 1 2 9 4 3 1]

出 願 人 協和醗酵工業株式会社
Applicant(s):

REC'D 26 NOV 2004

WIPO

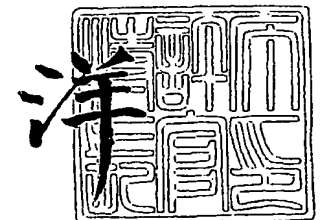
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 1 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 0 2 4 8 1

【書類名】 特許願
【整理番号】 H16-0741Y2
【提出日】 平成16年 4月26日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/13
【発明者】
【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
研究所内
【氏名】 飯田 茂
【発明者】
【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
研究所内
【氏名】 佐藤 光男
【発明者】
【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
研究所内
【氏名】 浦久保 美保
【発明者】
【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
研究所内
【氏名】 脇谷 雅子
【発明者】
【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
研究所内
【氏名】 内田 和久
【発明者】
【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
研究所内
【氏名】 丹羽 倫平
【発明者】
【住所又は居所】 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京
研究所内
【氏名】 設楽 研也
【特許出願人】
【識別番号】 000001029
【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社
【代表者】 松田 譲
【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2003-350168
【出願日】 平成15年10月 9日
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 008187
【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

ガングリオシドGM2に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物。

【請求項 2】

フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖である、請求項 1 に記載の抗体組成物。

【請求項 3】

ガングリオシドGM2発現細胞に特異的に結合する請求項 1 または 2 に記載の抗体組成物。

【請求項 4】

ガングリオシドGM2発現細胞に対し細胞傷害活性を示す請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

【請求項 5】

ガングリオシドGM2発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性を示す請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

【請求項 6】

細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性である請求項 4 または 5 に記載の抗体組成物。

【請求項 7】

細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性である請求項 4 または 5 に記載の抗体組成物。

【請求項 8】

それぞれ配列番号14、15および16で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

【請求項 9】

それぞれ配列番号17、18および19で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

【請求項 10】

それぞれ配列番号14、15および16で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号17、18および19で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2、CDR3を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

【請求項 11】

遺伝子組換え抗体がヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

【請求項 12】

ヒト型キメラ抗体がガングリオシドGM2に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) および軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、請求項 1 に記載の抗体組成物。

【請求項 13】

抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号20で示されるアミノ酸配列を含む請求項 12 に記載の抗体組成物。

【請求項 14】

抗体分子の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号21で示されるアミノ酸配列を含む請求項 12 に記載の抗体組成物。

【請求項 15】

抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号20で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L鎖) V領域が、配列番号21で示されるアミノ酸配列を含む請求項 12～14 のいずれか 1 項に記載のヒト型キメラ抗体組成物。

【請求項 16】

ヒト型CDR移植抗体がガングリオシドGM2に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) および軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) を含む、請求項 11 に記載の抗体組成物。

【請求項 17】

ガングリオシドGM2に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) および軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域 (FR) を含む、請求項 16 に記載の抗体組成物。

【請求項 18】

ガングリオシドGM2に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) および軽鎖 (L鎖) V領域の相補性決定領域 (CDR) とヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域 (FR)、ならびにヒト抗体のH鎖定常領域 (C領域) およびL鎖C領域を含む、請求項 16 または 17 に記載の抗体組成物。

【請求項 19】

抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号22で示されるアミノ酸配列のうち、38番目のArg、40番目のAla、43番目のGlnおよび44番目のGlyのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項 16～18 のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【請求項 20】

抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項 16～18 のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【請求項 21】

抗体分子の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項 16～18 のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【請求項 22】

抗体分子の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号25で示されるアミノ酸配列のうち、4番目のMet、11番目のLeu、15番目のVal、35番目のTyr、42番目のAla、46番目のLeu、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、77番目のLeuおよび103番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項 16～18 のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【請求項 23】

抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号22で示されるアミノ酸配列のうち、38番目のArg、40番目のAla、43番目のGlnおよび44番目のGlyから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖 (L鎖) V領域が、配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項 16～18、19 または 21 に記載の抗体組成物。

【請求項 24】

抗体分子の重鎖 (H鎖) 可変領域 (V領域) が、配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgから選ばれる少なくとも1つの

アミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項16～18、20または21に記載の抗体組成物。

【請求項25】

抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号25で示されるアミノ酸配列のうち、4番目のMet、11番目のLeu、15番目のVal、35番目のTyr、42番目のAla、46番目のLeu、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、77番目のLeuおよび103番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、請求項16～18、20または22のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【請求項26】

抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号22、23、26、27、28、29、30、配列番号22で示されるアミノ酸配列のうち、38番目のArg、40番目のAla、43番目のGlnおよび44番目のGlyのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列および配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求項16～20のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【請求項27】

抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、配列番号24、25、31、32、33、34、35、配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列および配列番号25で示されるアミノ酸配列のうち、4番目のMet、11番目のLeu、15番目のVal、35番目のTyr、42番目のAla、46番目のLeu、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、77番目のLeuおよび103番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む請求項16～18、21および22のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【請求項28】

抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号22、23、26、27、28、29、30、配列番号22で示されるアミノ酸配列のうち、38番目のArg、40番目のAla、43番目のGlnおよび44番目のGlyのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列および配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含み、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号24、25、31、32、33、34、35、配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列および配列番号25で示されるアミノ酸配列のうち、4番目のMet、11番目のLeu、15番目のVal、35番目のTyr、42番目のAla、46番目のLeu、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、77番目のLeuおよび103番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む請求項16～27のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【請求項29】

抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号26で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が配列番号31または32で示されるアミノ酸配列を含む請求

項 16～18 のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【請求項 30】

抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号22で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が配列番号32または35で示されるアミノ酸配列を含む請求項 16～18 のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【請求項 31】

ガングリオシドGM2に特異的に結合する抗体分子をコードするDNAを宿主細胞に導入して得られる、請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を生産する形質転換体。

【請求項 32】

宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素、またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失するようにゲノムが改変された細胞である、請求項 31 に記載の形質転換体。

【請求項 33】

宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素、またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞である、請求項 31 に記載の形質転換体。

【請求項 34】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素が、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD) またはGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) から選ばれる酵素である、請求項 32 または 33 に記載の形質転換体。

【請求項 35】

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の(a)および(b)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、請求項 34 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項 36】

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の (a)～(c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項 34 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号2で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質。

【請求項 37】

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a)および(b)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、請求項 34 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項 38】

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の (a)～(c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項 34 に記載の形質転換体。

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿

入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

【請求項 39】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α 1,6-フコシルトランスフェラーゼである請求項32または33に記載の形質転換体。

【請求項 40】

α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)～(d)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、請求項39に記載の形質転換体。

(a) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNA；

(c) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；

(d) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項 41】

α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)～(f)からなる群から選ばれる蛋白質である、請求項39に記載の形質転換体。

(a) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(c) 配列番号7で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(d) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号7で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(f) 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

【請求項 42】

形質転換体がFERM BP-8470である請求項41に記載の形質転換体。

【請求項 43】

宿主細胞が、下記の(a)～(i)からなる群から選ばれる細胞である請求項31～42のいずれか1項に記載の形質転換体。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞；

(b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；

(c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞；

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞；

(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(h) 胚性幹細胞；

(i) 受精卵細胞。

【請求項 44】

請求項 31～43 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該抗体組成物を採取し、精製する、請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物の製造方法。

【請求項 45】

請求項 44 に記載の製造方法により得られる、請求項 1～32 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物。

【請求項 46】

請求項 1～30 および 45 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

【請求項 47】

請求項 1～30 および 45 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分として含有するガングリオシド GM2 関連疾患の治療薬。

【請求項 48】

ガングリオシド GM2 関連疾患が癌である請求項 47 に記載の治療薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】ガングリオシドGM2に特異的に結合する抗体組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、ガングリオシドGM2に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含有する医薬に関する。

【背景技術】

【0002】

シアル酸を有する糖脂質の一種であるガングリオシドは、動物の細胞膜を構成しており、親水性側鎖である糖鎖と、疎水性側鎖であるスフィンゴシンおよび脂肪酸とから構成される分子である。ガングリオシドの種類と発現量は、細胞種、臓器種、動物種等によって異なる。さらに細胞が癌化する過程において、ガングリオシドの発現が量的および質的に変化することも知られている（非特許文献1）。

【0003】

例えば、悪性度が高いといわれている神経外胚葉系腫瘍である神経芽細胞腫、肺小細胞癌およびメラノーマでは、正常細胞にはほとんど認められないガングリオシドGD2、GD3、GM2等が発現していることが報告されており（非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6、非特許文献7）、このような腫瘍細胞に特異的なガングリオシドに対する抗体はヒトの様々な癌の治療に有用であると考えられている。

【0004】

一般にヒト以外の動物の抗体をヒトに投与すると、異物として認識され、副作用を惹起することや（非特許文献8、非特許文献9、非特許文献10、非特許文献11）、抗体の体内からの消失を速めることにより（非特許文献9、非特許文献12、非特許文献13）、抗体の治療効果を減じてしまうことが知られている（非特許文献14、非特許文献15）。

【0005】

これらの問題点を解決するために遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体をヒト型キメラ抗体、あるいはヒト型CDR移植抗体などのヒト化抗体にすることが試みられている（非特許文献16）。ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、免疫原性が低下し（非特許文献17）、治療効果が延長することが報告されている（非特許文献18、非特許文献19）。

【0006】

ガングリオシドGM2に対するヒト化抗体は、ヒトメラノーマの治療に有用であることが示されている（非特許文献20）。ガングリオシドGM2に特異的に反応し、上記のADCC活性やCDC活性等の細胞障害活性を有するヒト化抗体としては、ヒトIgGクラスのヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体が取得されている（特許文献3、特許文献4）。

また、ヒト化抗体は、遺伝子組換え技術を利用して作製するため、様々な形態の分子として作製することができる。例えば、エフェクター機能の高いヒト化抗体を作製することができる（非特許文献18）。特にGM2発現細胞数を減少させる治療においては、抗体のFc領域（抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域）を介した補体依存性細胞障害活性（以下、CDC活性と表記する）や抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC活性と表記する）等の細胞障害活性の高さがその治療効果に重要である。

【0007】

ヒトIgG1サブクラスの抗体は、そのFc領域および抗体レセプター（以下、FcγRと表記する）あるいは各種補体成分を介して、ADCC活性およびCDC活性を発現する。抗体とFcγRとの結合においては、抗体のヒンジ領域及びC領域の第2番目のドメイン（以下、Cγ2ドメ

インと表記する)に結合している糖鎖の重要性が示唆されている(非特許文献21)。

抗体IgG分子のFc領域に結合しているN-グリコシド結合複合型糖鎖の非還元末端へのガラクトースの付加、および還元末端のN-アセチルグルコサミンへのフコースの付加に関しては多様性があることが知られており(非特許文献22)、特に糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンへのフコースの付加により、抗体のADCC活性が大きく低下することが報告されている(特許文献3、非特許文献23)。

【0008】

一般に、医薬品として利用される抗体組成物の多くは、遺伝子組換え技術を用いて作製され、動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞などを宿主細胞として製造されているが、発現させた抗体組成物の糖鎖構造は宿主細胞によって異なる。従って、最適な薬理活性が発揮できるような糖鎖が付加されている抗体組成物を適切に調製し提供することが質の高い医療を患者へ提供する上で欠かせない。

【0009】

抗体生産細胞内の α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ(FUT8)、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ(GMD)、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ(FX)の活性を低下または欠失することにより、Fc領域を有する抗体分子からなる組成物中で、該組成物中に含まれるFc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を増加させることができる(特許文献4)。

【非特許文献1】Cancer Res., 45, 2405, (1985)

【非特許文献2】J. Exp. Med., 155, 1133, (1982)

【非特許文献3】J. Biol. Chem., 257, 12752, (1982)

【非特許文献4】Cancer Res., 47, 225, (1987)

【非特許文献5】Cancer Res., 47, 1098, (1987)

【非特許文献6】Cancer Res., 45, 2642, (1985)

【非特許文献7】Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 5392, (1983)

【非特許文献8】J. Clin. Oncol., 2, 881, (1984)

【非特許文献9】Blood, 65, 1349, (1985)

【非特許文献10】J. Natl. Cancer Inst., 80, 932, (1988)

【非特許文献11】Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 1242, (1985)

【非特許文献12】J. Nucl. Med., 26, 1011, (1985)

【非特許文献13】J. Natl. Cancer Inst., 80, 937, (1988)

【非特許文献14】J. Immunol., 135, 1530, (1985)

【非特許文献15】Cancer Res., 46, 6489, (1986)

【非特許文献16】Nature, 321, 522, (1986)

【非特許文献17】Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 4220, (1989)

【非特許文献18】Cancer Res., 56, 1118, (1996)

【非特許文献19】Immunol., 85, 668, (1995)

【非特許文献20】Lancet, 1, 786, (1989)

【非特許文献21】Chem. Immunol., 65, 88, (1997)

【非特許文献22】Biochemistry, 36, 130, (1997)

【非特許文献23】J. Biol. Chem., 278, 3466, (2003)

【特許文献1】特開平6-205694

【特許文献2】特開平10-257893

【特許文献3】W000/61739

【特許文献4】W002/31140

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的は、ガングリオシドGM2に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖

をFc領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含有する医薬等を提供することにある。本発明の抗体組成物はエフェクター機能が增強されており、エフェクター機能の增強された抗ガングリオシドGM2抗体は治療効果が増大し、投与量の減少による患者の負担の軽減が期待される。また、化学療法や放射性同位元素標識抗体などとの併用の必要性が無くなることによる副作用の低減なども期待される。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、以下の(1)～(48)に関する。

(1) ガングリオシドGM2に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物。

(2) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖である、(1)に記載の抗体組成物。

(3) ガングリオシドGM2発現細胞に特異的に結合する(1)または(2)に記載の抗体組成物。

(4) ガングリオシドGM2発現細胞に対し細胞傷害活性を示す(1)～(3)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【0012】

(5) ガングリオシドGM2発現細胞に対し、非ヒト動物由来ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体よりも高い細胞傷害活性を示す(1)～(4)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(6) 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性である(4)または(5)に記載の抗体組成物。

(7) 細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害(CDC)活性である(4)または(5)に記載の抗体組成物。

(8) それぞれ配列番号14、15および16で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖(H鎖)可変領域(V領域)の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3を含む、(1)～(7)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(9) それぞれ配列番号17、18および19で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3を含む、(1)～(7)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【0013】

(10) それぞれ配列番号14、15および16で示されるアミノ酸配列からなる抗体分子重鎖(H鎖)可変領域(V領域)の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3、およびそれぞれ配列番号17、18および19で示されるアミノ酸配列からなる抗体軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)1、CDR2、CDR3を含む、(1)～(9)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(11) 遺伝子組換え抗体がヒト型キメラ抗体またはヒト型CDR移植抗体である(1)～(10)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(12) ヒト型キメラ抗体がガングリオシドGM2に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)を含む、(11)に記載の抗体組成物。

(13) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号20で示されるアミノ酸配列を含む(12)に記載の抗体組成物。

【0014】

(14) 抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、配列番号21で示されるアミノ酸配列を含む(12)に記載の抗体組成物。

(15) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号20で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号21で示されるアミノ酸配列を含む(12)～(14)のいずれか1項に記載のヒト型キメラ抗体組成物。

(16) ヒト型CDR移植抗体がガングリオシドGM2に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)を含む、(11)に記載の抗体組成物。

【0015】

(17) ガングリオシドGM2に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)とヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域(FR)を含む、(16)に記載の抗体組成物。

(18) ガングリオシドGM2に特異的に結合するモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)および軽鎖(L鎖)V領域の相補性決定領域(CDR)とヒト抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のフレームワーク領域(FR)、ならびにヒト抗体のH鎖定常領域(C領域)およびL鎖C領域を含む、(16)または(17)に記載の抗体組成物。

(19) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号22で示されるアミノ酸配列のうち、38番目のArg、40番目のAla、43番目のGlnおよび44番目のGlyのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16)～(18)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【0016】

(20) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16)～(18)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(21) 抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16)～(18)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【0017】

(22) 抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、配列番号25で示されるアミノ酸配列のうち、4番目のMet、11番目のLeu、15番目のVal、35番目のTyr、42番目のAla、46番目のLeu、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、77番目のLeuおよび103番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16)～(18)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(23) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号22で示されるアミノ酸配列のうち、38番目のArg、40番目のAla、43番目のGlnおよび44番目のGlyから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16)～(18)、(19)または(21)に記載の抗体組成物。

【0018】

(24) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、

72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16)～(18)、(20)または(21)に記載の抗体組成物。

(25) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号25で示されるアミノ酸配列のうち、4番目のMet、11番目のLeu、15番目のVal、35番目のTyr、42番目のAla、46番目のLeu、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、77番目のLeuおよび103番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、(16)～(18)、(20)または(22)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(26) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号22、23、26、27、28、29、30、配列番号22で示されるアミノ酸配列のうち、38番目のArg、40番目のAla、43番目のGlnおよび44番目のGlyのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列および配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む、(16)～(20)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【0019】

(27) 抗体分子の軽鎖(L鎖)可変領域(V領域)が、配列番号24、25、31、32、33、34、35、配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列および配列番号25で示されるアミノ酸配列のうち、4番目のMet、11番目のLeu、15番目のVal、35番目のTyr、42番目のAla、46番目のLeu、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、77番目のLeuおよび103番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む(16)～(18)、(21)および(22)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【0020】

(28) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号22、23、26、27、28、29、30、配列番号22で示されるアミノ酸配列のうち、38番目のArg、40番目のAla、43番目のGlnおよび44番目のGlyのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列および配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含み、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が、配列番号24、25、31、32、33、34、35、配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列および配列番号25で示されるアミノ酸配列のうち、4番目のMet、11番目のLeu、15番目のVal、35番目のTyr、42番目のAla、46番目のLeu、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、77番目のLeuおよび103番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む(16)～(27)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

【0021】

(29) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号26で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が配列番号31または32で示されるアミノ酸配列を含む(16)～(18)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(30) 抗体分子の重鎖(H鎖)可変領域(V領域)が、配列番号22で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体分子の軽鎖(L鎖)V領域が配列番号32または35で示されるアミノ酸配列

を含む(16)～(18)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(31) ガングリオシドGM2に特異的に結合する抗体分子をコードするDNAを宿主細胞に導入して得られる、(1)～(30)のいずれか1項に記載の抗体組成物を生産する形質転換体。

【0022】

(32) 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素、またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失するようにゲノムが改変された細胞である、(31)に記載の形質転換体。

(33) 宿主細胞が、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素、またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞である、(31)に記載の形質転換体。

(34) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素が、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD) またはGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) から選ばれる酵素である、(32) または (33) に記載の形質転換体。

【0023】

(35) GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の(a)および(b)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、(34)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA;

(b) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA

。(36) GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼが、以下の(a)～(c)からなる群から選ばれる蛋白質である、(34)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;

(b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質;

(c) 配列番号2で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質。

【0024】

(37) GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の(a)および(b)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、(34)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNA;

(b) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0025】

(38) GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼが、以下の(a)～(c)からなる群から選ばれる蛋白質である、(34)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;

(b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質;

(c) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質。

【0026】

(39) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α 1,6-フコシルトランスフェラーゼである(32)または(33)に記載の形質転換体。

(40) α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)~(d)からなる群から選ばれるDNAがコードする蛋白質である、(39)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNA;

(b) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNA;

(c) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA;

(d) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【0027】

(41) α 1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の(a)~(f)からなる群から選ばれる蛋白質である、(39)に記載の形質転換体。

(a) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;

(b) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質;

(c) 配列番号7で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;

(d) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;

(e) 配列番号7で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質;

(f) 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

【0028】

(42) 形質転換体がFERM BP-8470である(41)に記載の形質転換体。

(43) 宿主細胞が、下記の(a)~(i)からなる群から選ばれる細胞である(31)~

(42)のいずれか1項に記載の形質転換体。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来CHO細胞;

(b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞;

(c) マウスミエローマ細胞株NS0細胞;

(d) マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞;

(e) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞;

(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞;

(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞;

(h) 胚性幹細胞;

(i) 受精卵細胞。

【0029】

(44) (31)~(43)のいずれか1項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該抗体組成物を採取し、精製する、(1)~(30)のいずれか1項に記載の抗体組成物の製造方法。

(45) (44)に記載の製造方法により得られる、(1)~(32)のいずれか1項に記載の抗体組成物。

(46) (1)~(30)および(45)のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

(47) (1)~(30)および(45)のいずれか1項に記載の抗体組成物を有効成分

分として含有するガングリオシドGM2関連疾患の治療薬。

(48) ガングリオシドGM2関連疾患が癌である(47)に記載の治療薬。

【発明の効果】

【0030】

本発明によりガングリオシドGM2に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含有する医薬が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

本発明のガングリオシドGM2に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる組成物であって、該N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物としては、該フコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合していない糖鎖を抗体分子のFc領域に有する遺伝子組換え抗体分子からなる抗体組成物があげられる。

【0032】

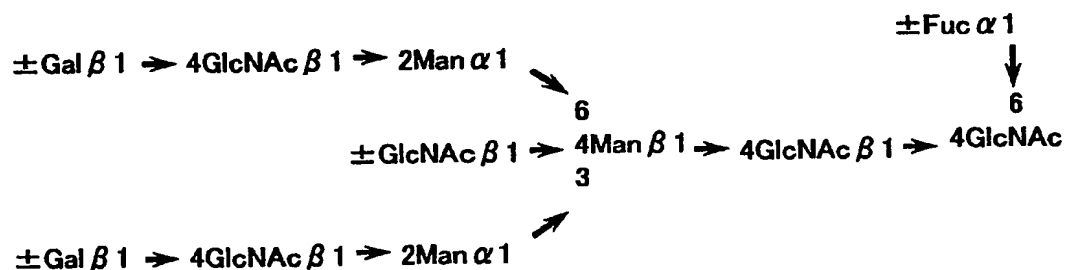
抗体分子にはFc領域があり、それらの領域にはN-グリコシド結合糖鎖が結合する。従って、抗体1分子あたり2本の糖鎖が結合している。N-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAcと表記する）の側鎖を並行して1ないしは複数本有し、更にGal-GlcNAcの非還元末端側にシアル酸、バイセクティングのN-アセチルグルコサミンなどを有するコンプレックス型（複合型）糖鎖を挙げることができる。

【0033】

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖としては、下記化学式1で示される。

【0034】

【化1】



【0035】

本発明において、フコースが結合する糖鎖としては、上記で示された化学式中のフコースの1位がN-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端側のN-アセチルグルコサミンの6位に α 結合している糖鎖があげられ、非還元末端の糖鎖の構造はいかなるものであってもよい。

本発明において、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していないとは、実質的にフコースが結合していないことをいう。実質的にフコースが結合していな

い抗体組成物とは、具体的には、後述の4に記載の糖鎖分析において、フコースが実質的に検出できない程度の抗体組成物である場合をいう。実質的に検出できない程度とは、測定の出検限界以下であることを意味する。糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない本発明の抗体組成物は、高いADCC活性を有する。

【0036】

N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物中に含まれる、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を有する抗体分子の割合は、抗体分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法[生物化学実験法23—糖蛋白質糖鎖研究法(学会出版センター)高橋禮子編(1989)]を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識又は同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖をHPAED-PAD法[ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー(J. Liq. Chromatogr.), 6, 1577(1983)]によって分析することによって決定することができる。

本発明の遺伝子組換え抗体組成物は、ヒト型キメラ抗体組成物およびヒト型CDR移植抗体組成物及びそれらの抗体断片組成物を包含する。

【0037】

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLとヒト抗体のCHおよびCLとからなる抗体をいう。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

本発明のヒト型キメラ抗体組成物は、ガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0038】

本発明のヒト型キメラ抗体組成物の製造に用いるヒト以外の動物の抗体としては、具体的には、特開平4-311385に記載のマウスモノクローナル抗体KM690、マウスモノクローナル抗体KM750およびマウスモノクローナル抗体KM796、Cancer Res., 46, 4116, (1986)に記載のモノクローナル抗体MoAb5-3、Cancer Res., 48, 6154, (1988)に記載のモノクローナル抗体MK1-16、モノクローナル抗体MK2-34、J. Biol. Chem., 264, 12122, (1989)に記載のモノクローナル抗体DMAb-1などがあげられる。また、ヒト抗体ではあるが、IgMクラスであるProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 7629, (1982)に記載のモノクローナル抗体なども本発明のヒト型キメラ抗体組成物の製造に用いられる。

【0039】

本発明において、ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン(以下、hIgと表記する)に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、 κ クラスあるいは λ クラスのものを用いることができる。

【0040】

本発明のガングリオシドGM2に特異的に結合するヒト型キメラ抗体組成物としては、配列番号14、15および16で示されるアミノ酸配列からなるVHのCDR1、CDR2、CDR3および/または配列番号17、18および19で示されるアミノ酸配列からなるVLのCDR1、CDR2、CDR3、を含む抗ガングリオシドGM2キメラ抗体組成物、抗体のVHが配列番号20で示されるアミノ酸配列および/またはVLが配列番号21で示されるアミノ酸配列を含む抗ガングリオシドGM2キメラ抗体組成物、抗体のVHが配列番号20で示されるアミノ酸配列およびヒト抗体のCHがhIgG1サブクラスのアミノ酸配列からなり、抗体のVLが配列番号21で示されるアミノ酸配列およびヒト抗体のCLが κ クラスのアミノ酸配列からなる抗ガングリオシドGM2キメラ抗体組成物などがあげられる。

【0041】

本発明のガングリオシドGM2に特異的に結合するヒト型キメラ抗体組成物が有するアミ

ノ酸配列としては、具体的には、W000/61739に記載のKM966が有するアミノ酸配列などがあげられる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRをヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体を意味する。

【0042】

本発明のヒト型CDR移植抗体組成物は、ガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRを任意のヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のH鎖C領域(以下、CHと表記する)およびL鎖C領域(以下、CLと表記する)をコードするDNAを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0043】

本発明のヒト型CDR移植抗体組成物の製造に用いるヒト以外の動物の抗体としては、具体的には、具体的には、特開平4-311385に記載のマウスモノクローナル抗体KM690、マウスモノクローナル抗体KM750およびマウスモノクローナル抗体KM796、Cancer Res., 46, 4116, (1986)に記載のモノクローナル抗体MoAb5-3、Cancer Res., 48, 6154, (1988)に記載のモノクローナル抗体MK1-16、モノクローナル抗体MK2-34、J. Biol. Chem., 264, 12122, (1989)に記載のモノクローナル抗体DMAb-1などがあげられる。また、ヒト抗体ではあるが、IgMクラスであるProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 79, 7629, (1982)に記載のモノクローナル抗体なども本発明のヒト型CDR移植抗体組成物の製造に用いられる。

【0044】

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のアミノ酸配列であれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、またはヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991)などがあげられる。

【0045】

本発明において、ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン(以下、hIgと表記する)に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するg1、g2、g3、g4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、kクラスあるいはlクラスのものを用いることができる。

【0046】

本発明のヒト型CDR移植抗体組成物としては、ガングリオシドGM2に特異的に反応するヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRを含むヒト型CDR移植抗体組成物があげられるが、好ましくは、それぞれ配列番号14、15、16で示されるアミノ酸配列からなる抗体VHのCDR1、CDR2、CDR3および/またはそれぞれ配列番号17、18、19で示されるアミノ酸配列からなるVLのCDR1、CDR2、CDR3を含むヒト型CDR移植抗体組成物または該抗体断片組成物などがあげられる。

【0047】

これらのヒト型CDR移植抗体組成物なかでも、抗体のVHが配列番号22で示されるアミノ酸配列のうち、38番目のArg、40番目のAla、43番目のGlnおよび44番目のGlyのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体組成物、抗体のVHが配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体組成物、抗体のVLが配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体組成物、抗体のVLが配列番号25で示されるアミノ酸配列のうち、4

番目のMet、11番目のLeu、15番目のVal、35番目のTyr、42番目のAla、46番目のLeu、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、77番目のLeuおよび103番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体組成物が好ましく、抗体のVHが配列番号22で示されるアミノ酸配列のうち、38番目のArg、40番目のAla、43番目のGlnおよび44番目のGlyのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLが配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体組成物、抗体のVHが配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLが配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体組成物、抗体のVHが配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLが配列番号25で示されるアミノ酸配列のうち、4番目のMet、11番目のLeu、15番目のVal、35番目のTyr、42番目のAla、46番目のLeu、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、77番目のLeuおよび103番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体組成物、がより好ましい。

【0048】

具体的には、抗体のVHが配列番号22、23、26、27、28、29、30、配列番号22で示されるアミノ酸配列のうち、38番目のArg、40番目のAla、43番目のGlnおよび44番目のGlyのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列および配列番号23で示されるアミノ酸配列のうち、67番目のArg、72番目のAla、84番目のSerおよび98番目のArgのうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列、および/またはVLが配列番号24、25、31、32、33、34、35、配列番号24で示されるアミノ酸配列のうち、15番目のVal、35番目のTyr、46番目のLeu、59番目のSer、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、72番目のPheおよび76番目のSerから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列および配列番号25で示されるアミノ酸配列のうち、4番目のMet、11番目のLeu、15番目のVal、35番目のTyr、42番目のAla、46番目のLeu、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、77番目のLeuおよび103番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体組成物、より具体的には、VHが配列番号26で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、VLが配列番号31または32で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体組成物、VHが配列番号22で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、VLが配列番号32または35で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体組成物、があげられる。

【0049】

本発明のヒト型CDR移植抗体組成物としては、VHが配列番号26で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、VLが配列番号31で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体組成物、VHが配列番号22で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、VLが配列番号32で示されるアミノ酸配列を含むヒト型CDR移植抗体組成物が最も好ましく用いられる。

本発明のヒト型CDR移植抗体組成物が有するアミノ酸配列の具体例としては、それぞれ特開平10-257893に記載の形質転換株 KM8966 (FERM BP-5105) が生産する KM8966、形質転換株 KM8967 (FERM BP-5106) が生産する KM8967、形質転換株 KM8969 (FERM BP-5527) が生産する KM8969、形質転換株 KM8970 (FERM BP-5528) が生産する KM8970 が有するアミノ酸配列などがあげられる。

【0050】

これらのアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつガングリオシドGM2鎖と特異的に結合する抗体または抗体断片も本発明の抗体組成物に包含される。

本発明の抗体組成物のアミノ酸配列において欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

【0051】

本発明の抗体組成物のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、同一配列中の任意かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味し、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じてよく、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸残基としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

【0052】

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

本発明の遺伝子組換え抗体組成物は、ガングリオシドGM2に特異的に結合する遺伝子組換え抗体の抗体断片からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体Fc領域の一部または全部を含んでいる抗体断片組成物を包含する。

【0053】

本発明の抗体断片組成物としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、diabody、dsFvおよびCDRを含むペプチドなどの抗体断片組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体Fc領域の一部または全部を含んでいる抗体断片組成物があげられる。

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される）、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0054】

本発明のFabは、本発明のガングリオシドGM2に特異的に結合する抗体組成物を蛋白質分

解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

F(ab')₂は、IgGを蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（H鎖の234番目のアミノ酸残基で切断される）、Fabがヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約10万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0055】

本発明のF(ab')₂は、本発明のガングリオシドGM2に特異的に結合する抗体組成物を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

【0056】

本発明のFab'は、本発明のガングリオシドGM2に特異的に結合するF(ab')₂組成物を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することができる。

【0057】

scFvは、1本のVHと1本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと表記する）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明のscFvは、本発明のガングリオシドGM2に特異的に結合する抗体組成物のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFvを製造することができる。

【0058】

diabodyは、scFvが二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

本発明のdiabodyは、本発明のガングリオシドGM2に特異的に結合する抗体組成物のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAをPのアミノ酸配列の長さが8残基以下となるように構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、diabodyを製造することができる。

【0059】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法（Protein Engineering, 7, 697-704, 1994）に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明のdsFvは、本発明のガングリオシドGM2に特異的に結合する抗体組成物のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFvを製造することができる。

【0060】

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

本発明のCDRを含むペプチドは、本発明のガングリオシドGM2に特異的に結合する抗体組成物のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターある

いは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDRを含むペプチドを製造することができる。

【0061】

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明の抗体組成物としては、上記の抗体断片組成物のうち、そのままの形状でN-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体Fc領域の一部または全部を含んでいる抗体断片でもよく、また、上記の抗体断片とN-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体Fc領域の一部または全部との融合蛋白質であってもよい。

【0062】

本発明の形質転換体としては、ガングリオシドGM2に特異的に結合する抗体分子をコードするDNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体であって、本発明の抗体組成物を生産する形質転換体であればいかなる形質転換体でも包含される。具体的な例としては、ガングリオシドGM2に特異的に結合する抗体分子をコードするDNAを以下の(a)または(b)などの宿主細胞に導入して得られる形質転換体があげられる。

(a) 細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性が欠失するようにゲノムが改変された細胞；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失するようにゲノムが改変された細胞。

【0063】

上述において、ゲノムが改変された細胞としては、具体的にはゲノム上の対立遺伝子のすべてがノックアウトされた細胞があげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ (GMD)、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ (Fx) などがあげられる。

【0064】

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼとしては、

(a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；

などがあげられる。

【0065】

GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼとしては、

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号2で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性を有する蛋白質；

などがあげられる。

【0066】

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼとしては、

(a) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNA；

(b) 配列番号3で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA；

などがあげられる。

【0067】

GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼとしては、

(a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号4で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性を有する蛋白質；

などがあげられる。

【0068】

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼがあげられる。

本発明において、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、下記(a)、(b)、(c)または(d)のDNAがコードする蛋白質、

(a) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNA

(c) 配列番号5で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA

(d) 配列番号6で表される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA

または、

(e) 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(f) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(g) 配列番号7で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(h) 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(i) 配列番号7で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

(j) 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質

等があげられる。

【0069】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号1または3で表される塩基配列を有するDNA、配列番号1または3で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAなどがあげられる。

【0070】

α 1,6-フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードするDNAとしては、配列番号5または6で表される塩基配列を有するDNA、配列番号5または6で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードするDNAなどがあげられる。

本発明において、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとは、例えば配列番号1、3、5または6で表される塩基配列からなるDNAなどのDNAまたはその一部の断片を

プローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989（以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1、3、5または6で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0071】

本発明において、配列番号2または4で表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素活性を有する蛋白質、または配列番号7または8で表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号1、3、5または6で表される塩基配列を有するDNAに部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1~数十個、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

【0072】

また、本発明において配列番号2、4、7または8であらわされるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつGDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ活性、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ活性、または α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質としては、具体的には、それぞれ配列番号2、4、7または8で表されるアミノ酸配列とBLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] やFASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)] 等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上、最も好ましくは99%以上の相同性を有する蛋白質などをあげることができる。

【0073】

また、本発明に用いられる宿主細胞、すなわち細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素、またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失した宿主細胞を取得する方法としては、目的とする酵素活性を欠失させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素活性を欠失させる手法としては、

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；

- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法;
- (d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法;
- (e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法などがあげられる。

【0074】

N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin)、エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒヨコチャワンタケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin)等を挙げることができる。

【0075】

レクチンに耐性な細胞とは、レクチンを有効濃度与えたときにも、生育が阻害されない細胞を言う。有効濃度とは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞(以下、親株とも称す)が正常に生育できない濃度以上であり、好ましくは、ゲノム遺伝子が改変される以前の細胞が成育できない濃度と同濃度、より好ましくは2~5倍、さらに好ましくは10倍、最も好ましくは20倍以上である。

【0076】

生育が阻害されないレクチンの有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよく、通常のレクチンの有効濃度は $10\mu\text{g/mL}$ ~ 10mg/mL 、好ましくは 0.5mg/mL ~ 2.0mg/mL である。

本発明の抗体組成物を生産させる宿主細胞としては、本発明の抗体組成物を発現できる上記宿主細胞であればいかなる細胞も包含する。例えば、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞などがあげられる。これらの細胞としては、後述1に記載のものがあげられ、特に、動物細胞の中でも、チャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞、ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞、マウスミエローマ細胞株NS0細胞、マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14細胞、シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞、抗体を産生するハイブリドーマ細胞、ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞などが好ましい。

【0077】

本発明の形質転換体としては、具体的には、本発明の抗ガングリオシドGM2鎖抗体の遺伝子を組み込んだチャイニーズハムスター卵巣組織由来のCHO細胞株CHO/DG44細胞由来の形質転換株Ms705/GM2があげられる。なお、CHO細胞株CHO/DG44細胞由来の形質転換株Ms705/GM2は、平成15年9月9日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6)にFERM BP-8470として寄託されている。

【0078】

本発明において、ガングリオシドGM2関連疾患としては、ガングリオシドGM2を発現する細胞が関与する疾患であればいかなるものも包含される。例えば、癌疾患のものがあげられる。

本発明の癌疾患としては、神経外胚葉系腫瘍である神経芽細胞腫、胚小細胞癌およびメラノーマなどが包含される。

【0079】

以下に、本発明の抗体組成物を生産する細胞の作製方法、本発明の抗体組成物の製造方法および本発明の抗体組成物の分析方法ならびに利用方法について説明する。

1. 本発明の抗体組成物を生産する細胞の作製

本発明の抗体組成物を生産する細胞(以下、本発明の細胞と称する)は、以下に述べる手法により、本発明の抗体組成物を生産するために用いる宿主細胞を作製し、該宿主細胞に後述2に記載の方法により、抗ガングリオシドGM2抗体をコードする遺伝子を導入することにより、作製することができる。

【0080】**(1) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法**

本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GDP-マンノース 4,6-デヒドラターゼ（以下、GMDと表記する）、GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ（以下、Fxと表記する）などがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

【0081】

ここでいう遺伝子とは、DNAまたはRNAを含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RNA-DNA オリゴヌクレオチド法（以下、RDO法と表記する）、RNAインターフェアレンス法（以下、RNAi法と表記する）、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法等があげられる。以下これらを具体的に説明する。

【0082】

(a) アンチセンス法又はリボザイム法による本発明の細胞を作製するための宿主細胞の作製

本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素遺伝子を標的とし、細胞工学, 12, 239 (1993)、バイオテクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 17, 1097 (1999)、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス(Hum. Mol. Genet.), 5, 1083 (1995)、細胞工学, 13, 255 (1994)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 96, 1886 (1999)等に記載されたアンチセンス法またはリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

【0083】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAあるいはゲノムDNAを調製する。

調製したcDNAあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNA部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムを設計する。

【0084】

該アンチセンス遺伝子、またはリボザイムを細胞内で発現させるために、調製したDNAの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

【0085】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の抗体組成

物を作製するために用いる宿主細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造または産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の抗体組成物を作製のために用いる宿主細胞を得ることもできる。

【0086】

本発明の抗体組成物を作製するために用いられる宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞があげられる。

【0087】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能であるか、ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子、またはリボザイムを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述2に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入方法としては、後述2に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、以下の方法があげられる。

【0088】

形質転換体を選択する方法

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失した細胞を選択する方法としては、文献[新生化学実験講座 3—糖質 I, 糖蛋白質(東京化学同人)日本生化学会編(1988)]、文献[細胞工学, 別冊, 実験プロトコルシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコル, 糖蛋白質・糖脂質・プロテオグリカン(秀潤社製)谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修(1996)]、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などを用いて、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法があげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子のmRNA量を測定するノーザン解析やRT-PCR法等があげられる。

【0089】

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAを調製する方法としては、例えば、下記に記載の方法があげられる。

【0090】

cDNAの調製方法

各種宿主細胞の組織又は細胞から全RNA又はmRNAを調製する。

調製した全RNA又はmRNAからcDNAライブラリーを作製する。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾

に關与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、デジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素をコードする遺伝子断片を取得する。

【0091】

取得した遺伝子断片をプローブとして用い、cDNAライブラリーをスクリーニングし、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に關与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に關与する酵素をコードするDNAを取得することができる。

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞のmRNAは市販のもの(例えばClontech社)を用いてもよいし、以下のようにしてヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から調製してもよい。

【0092】

ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法[メソツズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム(AGPC)法[アナリティカル・バイオケミストリー(Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)]などがあげられる。

【0093】

また、全RNAからpoly(A)⁺ RNAとしてmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法(モレキュラー・クローニング第2版)などがあげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社)などの市販のキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

【0094】

調製したヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞mRNAからcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies社)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社)を用いる方法などがあげられる。

【0095】

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE社、ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、 λ ZAP II (STRATAGENE社)、 λ gt10、 λ gt11 [ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ(DNA cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (Clontech社)、 λ ExCell (Pharmacia社)、pT7T31 8U (Pharmacia社)、pcD2 [モレキュラー・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] およびpUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)]等をあげることができる。

【0096】

cDNAライブラリーを作製するための宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、Escherichiacoli XL 1-Blue MRF' [STRATAGENE社、ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、Escherichiacoli C600 [ジェネティクス(Genetics), 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、Escherichiacoli K802 [ジャーナル・オ

ブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] および *Escherichia coli* JM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

【0097】

cDNAライブラリーは、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長cDNAの割合を下げて、完全長cDNAを効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [ジーン(Gene), 138, 171 (1994); ジーン(Gene), 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNAクローニング(羊土社)(1996); 遺伝子ライブラリーの作製法(羊土社) (1994)] を用いて調製して以下の解析に用いてもよい。

【0098】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の5'末端および3'末端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製したcDNAライブラリーを鋳型としてPCR法 [ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)] を用いてDNAの増幅を行うことにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得することができる。

【0099】

取得した遺伝子断片が細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAであることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM377DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

【0100】

該遺伝子断片をプローブとして、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションやブラークハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第2版) 等を用いて、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のDNAを取得することができる。

【0101】

また、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを使用し、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞に含まれるmRNAから合成したcDNAあるいはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法を用いて増幅することにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを取得することもできる。

【0102】

取得した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAの塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM377DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。

【0103】

決定したcDNAの塩基配列をもとに、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、取得したDNAがデータベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

【0104】

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号1または3に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られるN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号5または6に記載の塩基配列があげられる。

【0105】

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したDNA合成機model 392 (Perkin Elmer社製)等のDNA合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを取得することもできる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、以下に記載の方法があげられる。

【0106】

ゲノムDNAの調製方法

ゲノムDNAを調製する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems社) やUniversal GenomeWalkerTM Kits (CLONTECH社) などを用いることにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを取得することもできる。

【0107】

取得した細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするDNAの塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいはABI PRISM377DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。

【0108】

決定したゲノムDNAの塩基配列をもとに、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより、取得したDNAがデータベース中の遺伝子の中で細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードしている遺伝子であることを確認することもできる。

【0109】

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したDNA合成機mo

del 392 (Perkin Elmer社製) 等のDNA合成機で化学合成することにより、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを取得することもできる。

【0110】

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列としては、例えば配列番号9、10、11および12に記載の塩基配列があげられる。

上記の方法で得られるN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列としては、例えば配列番号13に記載の塩基配列があげられる。

【0111】

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

【0112】

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、公知の方法またはDNA合成機により調製することができる。具体的には、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードするcDNAおよびゲノムDNAの塩基配列のうち、連続した5~150塩基、好ましくは5~60塩基、より好ましくは10~40塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成して調製することができる。

【0113】

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴRNAおよび該オリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）等があげられる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

【0114】

(b) 相同組換え法による本発明の抗体組成物を作製するための宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用いて染色体を改変することによって作製することができる。

【0115】

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) (以下、「マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford

University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) (以下、「ES細胞を用いた変異マウスの作製」と略す) 等に記載の方法を用い、例えば以下のように行うことができる。

【0116】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する。

ゲノムDNAの塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子 (例えば、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子) を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

【0117】

作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、染色体上の標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の細胞の作製のために用いる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞があげられる。

【0118】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、上記1の(1)の(a)に記載のゲノムDNAの調製方法などがあげられる。

上記の方法で得られる細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号9、10、11および12に記載の塩基配列があげられる。

【0119】

上記の方法で得られるN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAの塩基配列として、例えば配列番号13に記載の塩基配列があげられる。

染色体上の標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、置換型、挿入型いずれでも用いることができる。

【0120】

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述3に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製(羊土社)(1995)等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリA選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては

、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第2版）やPCR法〔ピーシーアール・プロトコールズ(PCR Protocols), Academic Press (1990)] 等があげられる。

【0121】

(c) RDO方法による本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RDO法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

【0122】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAあるいはゲノムDNAを上記1の(1)の(a)に記載の方法を用い、調製する。

調製したcDNAあるいはゲノムDNAの塩基配列を決定する。

【0123】

決定したDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さのRDOのコンストラクトを設計し合成する。

合成したRDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の宿主細胞を作製することができる。

【0124】

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞があげられる。

【0125】

各種宿主細胞へのRDOの導入には、後述2に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(a)に記載のcDNAの調製方法などがあげられる。

【0126】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のゲノムDNAを調製する方法としては、例えば、上記1の(1)の(b)に記載のゲノムDNAの調製方法などがあげられる。

DNAの塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製)等のプラスミドにサブクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法〔プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)]等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

【0127】

RDOは、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。

RDOを宿主細胞に導入し、標的とした酵素、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に変異が生じた細胞を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

【0128】

また、前記1の(1)の(a)に記載の、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述1の(5)に記載の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述4または後述5に記載の産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

【0129】

RDOは、サイエンス(Science), 273, 1386 (1996); ネイチャー・メディシン(Nature Medicine), 4, 285 (1998); ヘパトロジー(Hepatology), 25, 1462 (1997); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960 (1999); ジーン・セラピー(Gene Therapy), 5, 1960 (1999); ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン(J. Mol. Med.), 75, 829 (1997); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8774 (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8768 (1999); ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nuc. Acids. Res.), 27, 1323 (1999); インベスティゲーション・オブ・ダーマトロジー(Invest. Dermatol.), 111, 1172 (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 16, 1343 (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 43 (2000); ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotech.), 18, 555 (2000)等の記載に従って設計することができる。

(d) RNAi法による本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、RNAi法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

【0130】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを上記1の(1)の(a)に記載の方法を用い、cDNAを調製する。

調製したcDNAの塩基配列を決定する。

決定したcDNAの配列に基づき、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さのRNAi遺伝子を設計する。

【0131】

該RNAi遺伝子を細胞内で発現させるために、調製したcDNAの断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得

ることができる。

【0132】

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞があげられる。

【0133】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体への組み込みが可能で、設計したRNAi遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述2に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述2に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

【0134】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、本項1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

【0135】

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のcDNAを調製する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載されたcDNAの調製方法などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の塩基配列に基づいて設計したRNAi遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を得ることもできる。

【0136】

RNAi遺伝子は、常法またはDNA合成機を用いることにより調製することができる。 RNAi遺伝子のコンストラクトは、[ネイチャー(Nature), 391, 806 (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 15502 (1998); ネイチャー(Nature), 395, 854 (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 5049 (1999); セル(Cell), 95, 1017 (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 1451 (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 13959 (1998); ネイチャー・セル・バイオロジー(Nature Cell Biol.), 2, 70 (2000)]等の記載に従って設計することができる。

【0137】

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞の作製

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genet.), 25, 35 (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵

素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

【0138】

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿まれた外来遺伝子に突然変異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞の中に導入する。

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンの配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

【0139】

外来遺伝子としては、宿主細胞のDNAに変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述2に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

【0140】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、本項1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

【0141】

(2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fxなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

【0142】

これらの酵素は、基質特異性を有したある特定の反応を触媒する酵素であり、このような基質特異性を有した触媒作用を有する酵素の活性中心を破壊することで、これらの酵素のドミナントネガティブ体を作製することができる。標的とする酵素のうち、GMDを例として、そのドミナントネガティブ体に作製について具体的に以下に述べる。

大腸菌由来のGMDの立体構造を解析した結果、4つのアミノ酸(133番目のトレオニン、135番目のグルタミン酸、157番目のチロシン、161番目のリシン)が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている(Structure, 8, 2, 2000)。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら4つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMDの補酵素NADPや基質であるGDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMDの酵素活性を担うこ

れら4つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来のGMDのドミナントネガティブ体の作製の結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO細胞由来のGMD（配列番号2）では、155番目のトレオニン、157番目のグルタミン酸、179番目のチロシン、183番目のリシンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

【0143】

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子（以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する）を用い、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。

【0144】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を調製する。

調製したドミナントネガティブ体遺伝子の全長DNAをもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

【0145】

該DNA断片、または全長DNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の細胞を作製するために用いる宿主細胞を作製することができる。

【0146】

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述2に記載の宿主細胞があげられる。

【0147】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述2に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述2に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

【0148】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述1（1）の（a）に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例え

ば、後述 1 の (5) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。

【0149】

(3) 酵素に突然変異を導入する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子に突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

【0150】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、Fxなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

酵素に突然変異を導入する方法としては、1) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、産生抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

【0151】

突然変異誘発処理としては、親株の細胞のDNAに点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。

具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第三版(朝倉書店)日本組織培養学会編(1996)、ネイチャー・ジェネティクス(Nature Genet.), 24, 314, (2000)等に記載の方法を挙げることができる。

【0152】

自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体を挙げることができる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項 1 の (1) の (a) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述 4 または後述 5 に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項の 1 の (5) に記載の方法があげられる。

【0153】

(4) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子を標的とし、アンチセンスRNA/DNA技術[バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10,

87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術 [Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)] 等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

【0154】

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素としては、具体的には、GMD、F_xなどがあげられる。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素としては、具体的には、 α 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 α -L-フコシダーゼなどがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素の活性またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性を測定する方法としては、例えば、本項1の(1)の(a)に記載の方法があげられる。

【0155】

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、本項1の(5)に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述4または後述5に記載の方法があげられる。

(5) N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

本発明の抗体組成物を作製するために用いる宿主細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

【0156】

N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol. Genet.)、12, 51 (1986)等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin) エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒヨロチャワソウタケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin) 等を挙げることができる。

【0157】

具体的には、1 μ g/mL~1mg/mLの濃度の上述のレクチンを含む培地で1日~2週間、好ましくは1日~1週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養容器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、本発明のN-グリコシド結合糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。

2. 抗体組成物の製造方法

本発明の抗体組成物は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 (以下、アンチボディズと略す)、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1993 (以下、モノクローナルアンチボディズと略す)、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996 (以下、アンチボディエンジニアリングと略す) 等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

【0158】

抗ヒトガングリオシドGM2鎖抗体分子の全長cDNAを調製し、該抗体分子をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

該DNA断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、抗体分子を生産する形質転換体を得ることができる。

【0159】

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

抗体分子のFc領域に結合するN-グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素、すなわち細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素またはN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が欠失した細胞を選択するか、または前述1に示された種々の人為的手法により得られた細胞を宿主細胞として用いることもできる。

【0160】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組込が可能で、目的とする抗体分子をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

cDNAは、前記1.の(1)の(a)に記載のcDNAの調製方法に従い、ヒト又は非ヒト動物の組織又は細胞より、目的とする抗体分子に特異的なプローブまたはプライマー等を用いて調製することができる。

【0161】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキサースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

【0162】

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイペロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [メソツズ・イン・エンザイモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriology), 153, 163 (1983)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 75, 1929 (1978)]に記載の方法等をあげることができる。

【0163】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990)]、pAS3-3 [特開平2-227075]、pCDM8 [ネイチャー (Nature), 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen社)、pREP4 (Invitrogen社)、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochemistry), 101, 1307 (1987)]、pAGE210等をあげることができる。

【0164】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモータ

一、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0165】

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 [特開平2-227075]、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 [マニピュレーティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [特許第2606856、特許第2517813]、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編 (1994)]、ウイルスベクター法 [マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第2版]等をあげることができる。

【0166】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、発現ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

【0167】

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにInvitrogen社)等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

【0168】

昆虫細胞としては、Spodopterafrugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusianiの卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記発現導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

【0169】

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

【0170】

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) [特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977]、エレクトロポレーション法 [特開昭60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [日本特許第2606856、日本特許第2517813] 等をあげることができる。

【0171】

抗体遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、Fc領域と他の蛋白質との融合蛋白質発現等を行うことができる。

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、導入した遺伝子によって糖あるいは糖鎖が付加された抗体分子を得ることができる。

【0172】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、抗体組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0173】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

【0174】

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15~40℃がよく、培養時間は、通常16時間~7日間である。培養中のpHは3.0~9.0に保持する。pHの調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0175】

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0176】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエシ

ジョン(The Journal of the American Medical Association), 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地[サイエンス(Science), 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地[ヴェウロロジー(Virology), 8, 396 (1959)]、199培地[プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)]、Whitten培地[発生工学実験マニュアル・トランスジェニック・マウスの作り方(講談社)勝木元也編(1987)]またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0177】

培養は、通常pH6.0~8.0、30~40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地(Pharmingen社)、Sf-900 II SFM培地(Life Technologies社)、ExCell 400、ExCell405(いずれもJRH Biosciences社)、Grace's Insect Medium[ネイチャー(Nature), 195, 788 (1962)]等を用いることができる。

【0178】

培養は、通常pH6.0~7.0、25~30℃等の条件下で、1~5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

【0179】

培養は、通常pH5.0~9.0、20~40℃の条件下で3~60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、抗体分子をコードするDNAを組み込んだ発現ベクターを保有する動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。

【0180】

抗体遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

抗体組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる抗体分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

【0181】

抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法[ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227 (1989); ジーン・デベロップメント(Genes Develop.), 4, 1288 (1990)]、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

【0182】

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードするDNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードするDNAを挿入し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入の後に抗体分子を発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

【0183】

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて抗体組成物を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、抗体組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該抗体組成物を採取することにより、該抗体組成物を製造することができる。

【0184】

動物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法〔アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション(American Journal of Clinical Nutrition), 63, 639S (1996); アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション(American Journal of Clinical Nutrition), 63, 627S (1996); バイオテクノロジー(Bio/Technology), 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする抗体組成物を生産させる方法があげられる。

【0185】

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭63-309192）または卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0186】

植物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば抗体分子をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); トレンド・イン・バイオテクノロジー(Trends in Biotechnology), 15, 45 (1997)] に準じて栽培し、抗体組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を生産する方法があげられる。

【0187】

抗体分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された抗体組成物は、例えば抗体組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75（三菱化学（株）製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia社）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

【0188】

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した抗体組成物の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

【0189】

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

以下に、本発明の抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体の組成物の製造方法について記すが、他の抗体組成物を当該方法と同様にして取得することもできる。

【0190】

(1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

【0191】

ヒト抗体のC領域としては、任意のヒト抗体のCHおよびCLであることができ、例えば、ヒト抗体のH鎖のIgG1サブクラスのC領域（以下、hC γ 1と表記する）およびヒト抗体のL鎖の κ クラスのC領域（以下、hC κ と表記する）等があげられる。

ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体DNAを用いることができ、また、mRNAから逆転写して作製されたcDNAを用いることもできる。

【0192】

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のC領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン (Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1 β d2-4 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスのLTR [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル (Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル (Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

【0193】

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体H鎖及びL鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と表記する）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖及びL鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。タンデム型のヒト化抗体発現ベクターとしては、pKANTEX93 [モレキュラー・イムノロジー (Mol. Immunol.), 37, 1035 (2000)]、pEE18 [ハイブリドーマ (Hybridoma), 17, 559 (1998)] などがあげられる。

【0194】

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

(2) ヒト以外の動物の抗体のV領域をコードするcDNAの取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは以下のようにして取得することができる。

【0195】

ガングリオシドGM2に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抽出し

たmRNAを鋳型として用い、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージ或いはプラスミド等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体のC領域或いはV領域をコードするDNAをプローブとして用い、H鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミド及びL鎖V領域をコードするcDNAを有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体のVHおよびVLの全塩基配列を決定し、塩基配列よりVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定する。

【0196】

ガングリオシドGM2に特異的に結合できるヒト以外の動物の抗体を生産するハイブリドーマ細胞は、ガングリオシドGM2をヒト以外の動物に免疫し、周知の方法（アンティボデイズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998)に従って、免疫された動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞とでハイブリドーマを作製し、次いで単一細胞化したハイブリドーマを選択し、これを培養し、培養上清から精製し、取得することができる。

【0197】

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全RNAからmRNAを調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989]等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞からmRNAを調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製)等があげられる。

【0198】

cDNAの合成及びcDNAライブラリー作製法としては、常法 [モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super ScriptTM Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL社製)やZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製)を用いる方法などがあげられる。

【0199】

cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターは、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ(Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、λZAP II (Stratagene社製)、λgt10、λgt11 [ディーエヌエー・クローニング：ア・プラクティカル・アプローチ(DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech社製)、λExCell、pT7T3 18U (Pharmacia社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)]及びpUC18 [ジーン(Gene), 33, 103 (1985)]等が用いられる。

【0200】

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌としては該cDNAライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ(Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス(Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス(Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・

バイオロジー(J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及びJM105 [ジーン(Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

【0201】

cDNAライブラリーからのヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAクローンを選択する方法としては、アイソトープ或いは蛍光などで標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはブランク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] により選択することができる。また、プライマーを調製し、cDNA或いはcDNAライブラリーを鋳型として、PCR [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology), Supplement 1-34] によりVHおよびVLをコードするcDNAを調製することもできる。

【0202】

上記方法により選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.), 74, 5463 (1977)] 等の反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、ABI PRISM377 DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより該cDNAの塩基配列を決定することができる。

【0203】

決定した塩基配列からVHおよびVLの全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列 [シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLを完全に含んでいるアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

【0204】

さらに、抗体可変領域のアミノ酸配列または該可変領域をコードするDNAの塩基配列がすでに公知である場合には、以下の方法を用いて製造することができる。

アミノ酸配列が公知である場合には、コドンの使用頻度 [シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] を考慮して該可変領域をコードするDNA配列を設計し、設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行うことによりDNAを得ることができる。塩基配列が公知である場合には、その情報を基に100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行うことによりDNAを得ることができる。

【0205】

(3) ヒト以外の動物の抗体のV領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列 [シーケンス・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さ及びN末端アミノ酸配列を推定でき、更には抗体が属するサブグループを知ることができる。また、VHおよびVLの各CDRのアミノ酸配列についても、同様の方法で見出すことができる。

【0206】

(4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

本項2の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子の上流に、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト

型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを、ヒト以外の動物の抗体VHおよびVLの3'末端側の塩基配列とヒト抗体のCHおよびCLの5'末端側の塩基配列とからなり、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAとそれぞれ連結し、それぞれを本項2の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

【0207】

(5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRを移植するヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank等のデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型CDR移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性(少なくとも60%以上)を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

【0208】

次に、選択したヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度[シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト(Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を設計する。設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR法を行う。この場合、PCRでの反応効率及び合成可能なDNAの長さから、H鎖、L鎖とも4~6本の合成DNAを設計することが好ましい。

【0209】

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項2の(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR後、増幅産物をpBluescript SK(-)(Stratagene社製)等のプラスミドにクローニングし、本項2の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

【0210】

(6) ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている[バイオ/テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLでは、CDRのみならず、FRのいくつかのアミノ酸残基が直接的或いは間接的に抗原結合活性に関与しており、それらアミノ酸残基がCDRの移植に伴い、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの異なるアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。この問題を解決するため、ヒト型CDR移植抗体では、ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基やCDRのアミノ酸残基と相互作用したり、抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを元のヒト以外の動物の抗体に由来するアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行

われている [バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。

【0211】

ヒト型CDR移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのためにX線結晶解析 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 112, 535 (1977)] 或いはコンピュータモデリング [プロテイン・エンジニアリング (Protein Engineering), 7, 1501 (1994)] 等による抗体の立体構造の構築及び解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型CDR移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型CDR移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討する等の種々の試行錯誤が必要である。

【0212】

ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸残基の改変は、改変用合成DNAを用いて本項2の(5)に記載のPCR法を行うことにより、達成できる。PCR後の増幅産物について本項2の(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

【0213】

(7) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

本項2の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流に、本項2の(5)および(6)で構築したヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを挿入し、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、本項2の(5)および(6)でヒト型CDR移植抗体のVHおよびVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、本項2の(1)に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入し、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

【0214】

(8) ヒト化抗体の安定的生産

本項2の(4)及び(7)に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体及びヒト型CDR移植抗体 (以下、併せてヒト化抗体と称す) を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

【0215】

動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平2-257891; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

【0216】

具体的には、マウスミエローマ細胞であるNS0細胞、SP2/0細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44細胞、ラットミエローマ細胞YB2/0細胞、IR983F細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるBHK細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞であるCHO/DG44細胞、ラットミエローマYB2/0細胞等があげられる。

【0217】

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418硫酸塩 (以下、G418と表記する; SIGMA社製) 等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640培地 (日水製薬社製)、GIT培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302培地 (JRH社製)、IMDM培地 (GIBCO BRL社製)、Hybridoma-SFM培地 (GIBCO BRL社製)、またはこれら培地に牛胎児血清 (以下、FCSと表記する) 等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産

蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量及び抗原結合活性は酵素免疫抗体法〔以下、ELISA法と表記する；アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1998、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996〕等により測定できる。また、形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、DHFR遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

【0218】

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる〔アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996〕。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、SDS変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動〔以下、SDS-PAGEと表記する；ネイチャー(Nature), 227, 680 (1970)〕やウエスタンブロッティング法〔アンティボディズ：ア・ラボラトリー・マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988、モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・プラクティス(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), Academic Press Limited, 1996〕等で測定することができる。

【0219】

以上、動物細胞を宿主とした抗体組成物の製造方法を示したが、上述したように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても動物細胞と同様の方法により抗体組成物を製造することができる。

すでに宿主細胞が抗体分子を発現する能力を有する場合には、上記1に記載した方法を用いて抗体分子を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、本発明の抗体組成物を製造することができる。

3. 抗体組成物の活性評価

精製した抗体組成物の蛋白量、抗原との結合活性あるいはエフェクター機能を測定する方法としては、モノクローナルアンチボディズ、あるいはアンチボディエンジニアリング等に記載の公知の方法を用いることができる。

【0220】

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性はELISA法及び蛍光抗体法〔キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)〕等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞傷害活性は、CDC活性、ADCC活性等を測定することにより、評価することができる〔キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)〕。

【0221】

また、抗体組成物のヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

4. 抗体組成物の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖構造は、通常の糖蛋白質の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

(1) 中性糖・アミノ糖組成分析

抗体分子の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

【0222】

具体的な方法として、Dionex社製糖組成分析装置を用いる方法があげられる。BioLCはH PAEC-PAD (high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection) 法 [ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (J.Liq.Chromatogr.), 6, 1577 (1983)] によって糖組成を分析する装置である。

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法 [アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agric.Biol.Chem.), 55(1), 283-284 (1991)] に従って酸加水分解した試料を2-アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、HPLC分析して組成比を算出することができる。

【0223】

(2) 糖鎖構造解析

抗体分子の糖鎖の構造解析は、2次元糖鎖マップ法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)、生物化学実験法23-糖蛋白質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989年)] により行うことができる。2次元糖鎖マップ法は、例えば、X軸には逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

【0224】

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PAと略記する) による糖鎖の蛍光標識 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197 (1984)] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰のPA化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa社製)、文献 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)] とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

【0225】

さらに各糖鎖のMALDI-TOF-MSなどの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

5. 抗体分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

抗体組成物は、抗体のFc領域に結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。本発明の抗体組成物は、Fc領域に結合する全N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が100%であり、高いADCC活性を示す。このような抗体組成物は、上記4. に記載の抗体分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

【0226】

レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いた抗体分子の糖鎖構造の識別は、文献 [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., (1995); 酵素免疫測定法, 第3版, 医学書院 (1987); 改訂版, 酵素抗体法, 学際企画 (1985)] 等に記載のウエスタン染色、RIA (Radioimmunoassay)、VIA (Viroimmunoassay)、EIA (Enzyme immunoassay)、FIA (Fluoroimmunoassay)、MIA (Metalloimmunoassay) などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

【0227】

抗体組成物を構成する抗体分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料である抗体組成物を反応させる。次に、標識したレクチンと抗体分子の複合体の量を測定する。

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA (T. vulgaris 由来のwheat-germ agglutinin)、ConA (C. ensiformis由来のconcanavalin A)、RIC (R. communis由来の毒素)、L-PHA (P. vulgaris由来のleukoagglutinin)、LCA (L. culinaris 由来のlentil agglutinin)、PSA (P. sativum由来のPea lectin)、AAL (Aleuria aurantia Lectin)、ACL (Amaranthus caudatus Lectin)、BPL (Bauhinia purpurea Lectin)、DSL (Datura stramonium Lectin)、DBA (Dolichos biflorus Agglutinin)、EBL (Elderberry Balk Lectin)、ECL (Erythrina cristagalli Lectin)、EEL (Euonymus europaeus Lectin)、GNL (Galanthus nivalis Lectin)、GSL (Griffonia simplicifolia Lectin)、HPA (Helix pomatia Agglutinin)、HHL (Hippeastrum Hybrid Lectin)、Jacalin、LTL (Lotus tetragonolobus Lectin)、LEL (Lycopersicon esculentum Lectin)、MAL (Maackia amurensis Lectin)、MPL (Maclura pomifera Lectin)、NPL (Narcissus pseudonarcissus Lectin)、PNA (Peanut Agglutinin)、E-PHA (Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin)、PTL (Psophocarpus tetragonolobus Lectin)、RCA (Ricinus communis Agglutinin)、STL (Solanium tuberosum Lectin)、SJA (Sophora japonica Agglutinin)、SBA (Soybean Agglutinin)、UEA (Ulex europaeus Agglutinin)、VVL (Vicia villosa Lectin)、WFA (Wisteria floribunda Agglutinin)があげられる。

【0228】

N-グルコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチンLCA (Lens Culinaris由来のLentil Agglutinin) エンドウマメレクチンPSA (Pisum sativum由来のPea Lectin)、ソラマメレクチンVFA (Vicia faba由来のAgglutinin)、ヒヨコチャワントケレクチンAAL (Aleuria aurantia由来のLectin)を挙げることができる。

【0229】

6. 本発明の抗体分子の利用

本発明の抗体組成物はガングリオシドGM2に特異的に結合し、高い抗体依存性細胞傷害(ADCC) 活性および補体依存性細胞障害(CDC) 活性を有するため、癌をはじめとする各種ガングリオシドGM2発現細胞関連疾患の予防および治療において有用である。

【0230】

ガングリオシドGM2は、正常細胞にはごく微量にしか存在しないが、肺小細胞癌、メラノーマ、神経芽細胞腫などの癌細胞では多量に存在し、GM2に対するモノクローナル抗体は、これらの癌の治療に有用であると考えられている〔ランセット (Lancet), 48, 6154 (1988)〕。通常の抗癌剤は、これらの癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、抗体依存性細胞傷害活性または補体依存性細胞障害活性を有する抗体は、癌細胞に細胞死を誘導することができるため、通常の抗癌剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不十分であり、化学療法との併用療法が行われているが〔サイエンス (Science), 280, 1197 (1998)〕、本発明の抗体組成物単独でのより強い抗腫瘍効果が認められれば、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもなる。

【0231】

本発明の抗体組成物を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

【0232】

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【0233】

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0234】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、抗体組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

【0235】

また、噴霧剤は該抗体組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0236】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人1日当たり $10\mu\text{g/kg}$ ~ 20mg/kg である。

また、抗体組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC活性測定法、ADCC活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。

【0237】

CDC活性、ADCC活性、抗腫瘍実験は、文献[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer Immunology Immunotherapy), 36, 373 (1993); キャンサー・リサーチ(Cancer Research), 54, 1511 (1994)]等記載の方法に従って行うことができる。

以下に、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

【0238】

ゲノム上の $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼ(以下、FUT8と表記する)両対立遺伝子を破壊したCHO/DG44細胞の造成

FUT8両対立遺伝子の翻訳開始コドンを含むゲノム領域を欠失させたCHO/DG44細胞株を以下の手順で造成した。

1. チャイニーズハムスターFUT8遺伝子のエクソン2を含むターゲティングベクターpKOFUT8Neoの構築

WO02/31140の実施例13の1項に記載の方法で構築されたチャイニーズハムスターFUT8遺伝子のエクソン2を含むターゲティングベクターpKOFUT8PuroおよびpK0SelectNeo (Lexicon社製)を用いて、以下のようにしてpKOFUT8Neoを構築した。

【0239】

pK0SelectNeo (Lexicon社製)を制限酵素AscI (New England Biolabs社製)で消化後、ア

ガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101社製) を用いてネオマイシン耐性遺伝子発現ユニットを含む約1.6KbのAscI断片を回収した。

次に、pKOFUT8Puroを制限酵素AscI (New England Biolabs社製) で消化後、大腸菌C15株由来Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) により、DNA断片の末端を脱リン酸化させた。反応後、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を用いて、DNA断片を精製した。

【0240】

上記で得たpK0SelectNeo由来のAscI断片 (約1.6Kb) 0.1 μ g と pKOFUT8Puro由来のAscI断片 (約10.1Kb) 0.1 μ g に滅菌水を加えて5 μ Lとし、Ligation High (東洋紡社製) 5 μ Lを加えて16℃で30分間反応させることにより、連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌DH5 α 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性クローンより各々プラスミドDNAを調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 (Applied Biosystems社製) を用いて添付の説明書に従って反応後、同社のDNAシーケンサABI PRISM 377により塩基配列を解析した。このようにして図1に示したpKOFUT8Neoを得た。pKOFUT8NeoはCHO細胞のFUT8遺伝子ヘミノックアウト細胞株を作製するためのターゲティングベクターとして用いた。

2. ゲノム上のFUT8遺伝子の1コピーを破壊したヘミノックアウト細胞株の作製

(1) ターゲティングベクターpKOFUT8Neo導入株の取得

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) を欠損したチャイニーズハムスター卵巣由来CHO/DG44細胞 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555, 1986] に、実施例1の1項で構築したチャイニーズハムスターFUT8ゲノム領域ターゲティングベクターpKOFUT8Neoを以下のようにして導入した。

【0241】

pKOFUT8Neoを制限酵素SalI (New England Biolabs社製) で消化して線状化し、線状化した4 μ gのpKOFUT8Neoを 1.6×10^6 個のCHO/DG44細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入した後、IMDM-dFBS (10)-HT (1) [透析FBS (インビトロジェン社製) を10%、HT supplement (インビトロジェン社製) を1倍濃度で含むIMDM培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、接着細胞培養用10cmデッシュ (Falcon社製) へ播種した。5%CO₂ インキュベーター内で37℃、24時間培養後、G418 (ナカライテスク社製) を600 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS (10) [透析FBSを10%で含むIMDM培地] 10mLに培地交換した。この培地交換作業を3~4日毎に繰り返しながら5%CO₂ インキュベーター内で37℃、15日間の培養を行い、G418耐性クローンを取得した。

(2) ゲノムPCRによる相同組換えの診断

本項(1)で取得したG418耐性クローンの相同組換えの診断を、ゲノムDNAを用いたPCRにより、以下のように行った。

【0242】

96穴プレート上のG418耐性クローンに対してトリプシン処理を行った後、2倍容量の凍結培地 [20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM] を各ウェルに添加、懸濁した。各ウェル中の細胞懸濁液の半量を接着細胞用平底96穴プレート (旭テクノグラス社製) へ播種してレプリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存した。

レプリカプレート上のネオマイシン耐性クローンは、G418を600 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS (10) で5%CO₂ インキュベーター内で37℃、1週間培養した後、細胞を回収し、回収した細胞から公知の方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 201, 331 (1992)] に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々30 μ LのTE-RNase緩衝液 (pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA、200 μ g/mL RNase A] に一晩溶解した。

【0243】

ゲノムPCRに用いるプライマーは以下のように設計した。まず、W003/31140の実施例12に記載の方法により取得したFUT8ゲノム領域の配列 (配列番号13) の中から、配列番号36または配列番号37でそれぞれ示されるプライマーをフォワードプライマーとした。また、

ターゲティングベクターのloxP配列に特異的に結合するプライマー（配列番号38または配列番号39）をリバースプライマーとし、以下のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に用いた。上記で調製したゲノムDNA溶液を各々10 μ L含む25 μ Lの反応液[DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)、ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー（フォワードプライマーとリバースプライマーを組み合わせ使用）]を調製し、94 $^{\circ}$ Cで3分間の加熱の後、94 $^{\circ}$ Cで1分間、60 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで2分間からなる反応を1サイクルとした条件でPCRを行った。

【0244】

PCR後、該反応液を0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、相同組換えによって生じる約1.7Kbの特異的増幅産物が認められた株を陽性クローンと判定した。

(3) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項(2)で取得された陽性クローンの相同組換えの診断を、ゲノムDNAを用いたサザンプロットにより、以下のように行った。

【0245】

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、本項(2)で見出された陽性クローンを含む96穴プレートを選択し、5%CO₂ インキュベーター内で37 $^{\circ}$ C、10分間静置した後、陽性クローンに該当するウェル中の細胞を接着細胞用平底24穴プレート（グライナー社製）へ播種した。G418を600 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10)を用いて5%CO₂ インキュベーター内で37 $^{\circ}$ C、1週間培養した後、接着細胞用平底6穴プレート（グライナー社製）へ播種した。該プレートを5%CO₂ インキュベーター内で37 $^{\circ}$ Cにて培養し、細胞を回収した。回収した細胞より公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々150 μ L のTE-RNase緩衝液(pH8.0) に一晚溶解した。

【0246】

上記で調製したゲノムDNA 12 μ gを制限酵素BamHI(New England Biolabs社製)で消化し、エタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、20 μ LのTE緩衝液(pH8.0) [10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA] に溶解し、0.6%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノムDNAを転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し80 $^{\circ}$ Cで2時間の熱処理を行い、固定化した。

【0247】

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。W003/31140の実施例12に記載の方法により取得したFUT8ゲノム領域の配列（配列番号13）の中から、配列番号40および配列番号41でそれぞれ示されるプライマーを作製し、以下のPCRに用いた。W002/31140の実施例12に記載のpFUT8fgE2-2 4.0ngをテンプレートとして含む20 μ Lの反応液[DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)、ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー]を調製し、94 $^{\circ}$ Cで1分間の加熱の後、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、55 $^{\circ}$ Cで30秒間、74 $^{\circ}$ Cで1分間からなる反応を1サイクルとした25サイクルの条件でPCRを行った。

【0248】

PCR後、該反応液を1.75%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101社製) を用いて約230bpのプローブDNA断片を回収した。得られたプローブDNA溶液のうち5 μ Lを、[α -³²P] dCTP 1.75MBqおよび Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のゲノムDNA消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、15mLのハイブリダイゼーション液 [5 \times SSP E、50 \times Denhardt's液、0.5%(w/v) SDS、100 μ g/mL サケ精子DNA] を加えて65 $^{\circ}$ Cで3時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、³²P標識したプローブDNAを熱変性してボトルへ投入し、65 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。

【0249】

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を50mLの一次洗浄液 [2×SSC-0.1%(w/v) SDS] に浸漬し、65℃で15分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を2回繰り返した後、ナイロン膜を50mLの二次洗浄液 [0.2×SSC-0.1%(w/v) SDS] に浸漬し、65℃で15分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80℃で暴露し現像した。

図2には、親株であるCHO/DG44細胞、および本項(2)で取得した陽性クローンである50-10-104株のゲノムDNAを本法により解析した結果を示した。CHO/DG44細胞では、野生型FUT8対立遺伝子由来の約25.5Kbの断片のみが検出された。一方、陽性クローン50-10-104株では、野生型FUT8対立遺伝子由来の約25.5Kbの断片に加え、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約20.0Kbの断片が検出された。両断片の量比は1:1であったことから、50-10-104株は、FUT8対立遺伝子のうち1コピーが破壊されたヘミノックアウトクローンであることが確認された。

【0250】

3. ゲノム上のFUT8遺伝子をダブルノックアウトしたCHO/DG44細胞の作製

(1) ターゲティングベクターpKOFUT8Puro導入株の作製

本実施例の2項で得たFUT8遺伝子ヘミノックアウトクローンのもう一方のFUT8対立遺伝子を破壊するために、WO02/31140の実施例13の1項に記載のチャイニーズハムスターFUT8遺伝子エクソン2ターゲティングベクターであるpKOFUT8Puroを以下のようにして導入した。

【0251】

pKOFUT8Puroを制限酵素SalI (New England Biolabs社製)で消化して線状化し、線状化した4μgのpKOFUT8Puroを 1.6×10^6 個のFUT8遺伝子ヘミノックアウトクローンへエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、IMDM-dFBS (10)-HT(1)に懸濁し、接着細胞培養用10cmデッシュ (Falcon社製)へ播種した。5%CO₂インキュベーター内で37℃、24時間培養後、ピューロマイシン (SIGMA社製)を15μg/mLの濃度で含むIMDM-dFBS (10)-HT(1) 10mLに培地交換した。この培地交換作業を7日毎に繰り返しながら5%CO₂インキュベーター内で37℃、15日間の培養を行い、ピューロマイシン耐性クローンを取得した。

【0252】

(2) ゲノムサザンプロットによる相同組換えの診断

本項(1)で取得された薬剤耐性クローンの相同組換えの診断を、ゲノムDNAを用いたサザンプロットにより以下のように行った。

ピューロマイシン耐性クローンを、公知の方法 [Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)] に従って接着細胞用平底プレート (旭テクノグラス社製)へ採取し、ピューロマイシン (SIGMA社製)を15μg/mLの濃度で含むIMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて5%CO₂インキュベーター内で37℃、1週間培養した。

【0253】

培養後、上記プレートの各クローンに対しトリプシン処理を行い、接着細胞用平底24穴プレート (グライナー社製)へ播種した。ピューロマイシン (SIGMA社製)を15μg/mLの濃度で含むIMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて5%CO₂インキュベーター内で37℃、1週間培養した後、同様にトリプシン処理を行い、接着細胞用平底6穴プレート (グライナー社製)へ播種した。該プレートを5%CO₂インキュベーター内で37℃にて培養し、回収した細胞より公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)] に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々150μLのTE-RNase緩衝液 (pH8.0)に一晩溶解した。

【0254】

上記で調製したゲノムDNA 12μgを制限酵素BamHI (New England Biolabs社製)で消化し、エタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、20μLのTE緩衝液 (pH8.0)に溶解し、0.6%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. US A), 76, 3683, (1979)] に従って、ナイロン膜へゲノムDNAを転写した。転写後、ナイロ

ン膜に対し80℃で2時間の熱処理を行い、固定化した。

【0255】

一方、サザンブロットに用いるプローブを以下のように調製した。まず、ターゲティングベクターに含まれるFUT8ゲノム領域よりもさらに5'側の配列に特異的に結合するプライマー（配列番号42および配列番号43）を作製し、以下のPCRに用いた。W002/31140の実施例12に記載のプラスミドpFUT8fgE2-2 4.0ngをテンプレートとして含む20 μ Lの反応液[DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)、ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー]を調製し、94℃で1分間の加熱の後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、74℃で1分間からなる反応を1サイクルとした25サイクルの条件でPCRを行った。

【0256】

PCR後、該反応液を1.75%(w/v) アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101社製)を用いて約230bpのプローブDNA断片を精製した。得られたプローブDNA溶液のうち5 μ Lを、[α -³²P] dCTP 1.75MBqおよび Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のゲノムDNA消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、15mLのハイブリダイゼーション液 [5 \times SSP E、50 \times Denhardt's液、0.5%(w/v) SDS、100 μ g/mL サケ精子DNA]を加えて65℃で3時間のプレハイブリダイゼーションを行った後、³²P標識したプローブDNAを熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

【0257】

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を50mLの一次洗浄液 [2 \times SSC-0.1%(w/v) SDS]に浸漬し、65℃で15分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を2回繰り返した後、ナイロン膜を50mLの二次洗浄液 [0.2 \times SSC-0.1%(w/v) SDS]に浸漬し、65℃で15分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80℃で暴露し現像した。

図3には、50-10-104株から本項(1)に記載の方法により取得したピューロマイシン耐性クローンの1つであるWK704株のゲノムDNAを本法により解析した結果を示した。WK704株では、野生型FUT8対立遺伝子由来の約25.5Kbの断片が消失し、相同組換えされた対立遺伝子に特異的な約20.0Kbの断片（図中に矢印で示す）のみが検出された。この結果からWK704株は、FUT8両対立遺伝子が破壊されたクローンであることが確認された。

【0258】

4. FUT8遺伝子をダブルノックアウトした細胞からの薬剤耐性遺伝子の除去

(1) Creリコンビナーゼ発現ベクターの導入

本実施例の3項で取得したFUT8遺伝子ダブルノックアウトクローンの薬剤耐性遺伝子を除去することを目的として、Creリコンビナーゼ発現ベクターpBS185 (Life Technologies社製)を以下のようにして導入した。

【0259】

4 μ gのpBS185を 1.6×10^6 個のFUT8遺伝子ダブルノックアウトクローンへエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、IMDM-dFBS (10)-HT(1) 10mLに懸濁し、さらに同培地を用いて2万倍に希釈した。該希釈液を接着細胞培養用10cm ディッシュ (Falcon社製) 7枚へ播種後、5%CO₂ インキュベーター内で37℃、10日間の培養を行い、コロニーを形成させた。

・ Creリコンビナーゼ発現ベクター導入株の取得

本項(1)で取得したコロニーのうち、任意のクローンを公知の方法 [Gene Targeting, Oxford University Press, (1993)]に従って接着細胞用平底プレート (旭テクノガラス社製)へ採取し、IMDM-dFBS(10)-HT(1)を用いて5%CO₂ インキュベーター内で37℃、1週間培養した。

【0260】

培養後、上記プレートの各クローンに対してトリプシン処理を行い、2倍容量の凍結培地 [20% DMSO、40% ウシ胎児血清、40% IMDM]を各ウェルに添加、懸濁した。各ウェル中の細胞懸濁液の半量を接着細胞用平底96穴プレート (旭テクノガラス社製)へ播種してレ

プリカプレートとする一方、残りの半量をマスタープレートとして凍結保存した。

次にレプリカプレート上の細胞を、G418を600 μ g/mL、ピューロマイシンを15 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて5%CO₂インキュベーター内で37℃、一週間培養した。Creリコンビナーゼの発現によりloxP配列に挟まれた薬剤耐性遺伝子が除去された陽性クローンは、G418およびピューロマイシン存在下で死滅する。本法により陽性クローンを選択した。

【0261】

(3) ゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断

本項(2)で選択した陽性クローンに対し、以下の手順でゲノムサザンプロットによる薬剤耐性遺伝子除去の診断を行った。

本項(2)で凍結保存したマスタープレートのうち、上記陽性クローンを含む96穴プレートを選択し、5%CO₂インキュベーター内で37℃、10分間静置した。静置後、上記クローンに該当するウェルから細胞を接着細胞用平底24穴プレート(グライナー社製)へ播種した。IMDM-dFBS (10)-HT(1)を用いて1週間培養した後、トリプシン処理を行い、接着細胞用平底6穴プレート(グライナー社製)へ播種して5%CO₂インキュベーター内で37℃で培養し、増殖した細胞を回収した。回収した細胞より公知の方法[ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research), 3, 2303, (1976)]に従って各クローンのゲノムDNAを調製し、各々150 μ LのTE-RNase緩衝液(pH8.0)に一晩溶解した。

【0262】

上記で調製したゲノムDNA 12 μ gを制限酵素NheI(New England Biolabs社製)で消化し、エタノール沈殿法を用いてDNA断片を回収した後、20 μ LのTE緩衝液(pH8.0)に溶解し、0.6%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、公知の方法[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 3683, (1979)]に従って、ナイロン膜へゲノムDNAを転写した。転写終了後、ナイロン膜に対し80℃で2時間の熱処理を行い、固定化した。

【0263】

一方、サザンプロットに用いるプローブを以下のように調製した。ターゲティングベクターに含まれるFUT8ゲノム領域よりもさらに5'側の配列に特異的に結合するプライマー(配列番号42および配列番号43)を用いて、以下のPCRを行った。W002/31140の実施例12に記載のpFUT8fgE2-2 4.0ngをテンプレートとして含む20 μ Lの反応液[DNAポリメラーゼExTaq(宝酒造社製)、ExTaq buffer(宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 μ mol/L 上記プライマー]を調製し、94℃で1分間の加熱の後、94℃で30秒間、55℃で30秒間、74℃で1分間からなる反応を1サイクルとした25サイクルの条件でPCRを行った。

【0264】

PCR後、該反応液を1.75%(w/v)アガロースゲル電気泳動に供し、GENECLEAN Spin Kit (BIO101社製)を用いて、約230bpのプローブDNA断片を精製した。得られたプローブDNA溶液のうち5 μ Lを、[α -³²P] dCTP 1.75MBqおよび Megaprime DNA Labelling system, dCTP (Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて放射線標識した。

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。まず、上記のゲノムDNA消化物が転写されたナイロン膜をローラーボトルへ封入し、ハイブリダイゼーション液[5×SSPE、50×Denhardt's液、0.5%(w/v) SDS、100 μ g/mL サケ精子DNA] 15mLを加えて65℃で3時間のプレハイブリダイゼーション後、³²P標識したプローブDNAを熱変性してボトルへ投入し、65℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。

【0265】

ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を50mLの一次洗浄液[2×SSC-0.1%(W/V) SDS]に浸漬し、65℃で15分間加温して洗浄した。上記の洗浄操作を2回繰り返した後、ナイロン膜を50mLの二次洗浄液[0.2×SSC-0.1%(W/V) SDS]に浸漬し、65℃で15分間加温して洗浄した。洗浄後、ナイロン膜をX線フィルムへ-80℃で暴露し現像した。

図4には、親株であるCHO/DG44細胞、本実施例の2項に記載の50-10-104株、本実施例の3項に記載のWK704株、およびWK704株から本項(2)に記載の方法により取得した薬剤感受性

クローンの1つである4-5-C3株のゲノムDNAを、本法により解析した結果を示した。CHO/DG44細胞では、野生型FUT8対立遺伝子に由来する約8.0KbのDNA断片のみが検出された。また、50-10-104株やWK704株では、相同組換えが起こった対立遺伝子に由来する約9.5KbのDNA断片が認められた。一方、4-5-C3株では、相同組換えが起こった対立遺伝子からさらにネオマイシン耐性遺伝子(約1.6Kb)およびピューロマイシン耐性遺伝子(約1.5Kb)が除去されて生じる約8.0KbのDNA断片のみが検出された。この結果から4-5-C3株は、Creリコンビナーゼにより薬剤耐性遺伝子が除去されたことが確認された。

薬剤耐性遺伝子の除去されたFUT8遺伝子ダブルノックアウトクローン(以下、FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞と表記する)は、4-5-C3株以外にも複数株取得された。

【実施例2】

【0266】

FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞による抗ガングリオシドGM2ヒトCDR移植抗体組成物の発現

1. FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞での安定発現

実施例1の4項に記載のFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞および親株であるCHO/DG44細胞に、特開平10-257893 記載の抗ガングリオシドGM2ヒト型CDR移植抗体発現ベクターpKANTEX796HM2Lm-28No.1を導入し、抗ガングリオシドGM2ヒト型CDR移植抗体組成物の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

【0267】

pKANTEX796HM2Lm-28No.1を制限酵素AatII (New England Biolabs社製)で消化して線状化した後、直線状化された $10\mu\text{g}$ のpKANTEX1259HV3LV0を 1.6×10^6 個のFUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞および親株であるCHO/DG44細胞へエレクトロポレーション法[サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]により導入後、10mLのIMDM-dFBS (10)-HT(1) [透析FBS(インビトロジェン社製)を10%、HT supplement(インビトロジェン社製)を1倍濃度で含むIMDM培地(インビトロジェン社製)]に懸濁し、 75cm^2 フラスコ(グライナー社製)に播種した。5%CO₂インキュベーター内で37℃、24時間培養後、G418(ナカライテスク社製)を $500\mu\text{g/mL}$ の濃度で含むIMDM-dFBS(10) [透析FBSを10%で含むIMDM培地]に培地交換し、1~2週間培養した。最終的にG418を $500\mu\text{g/mL}$ の濃度で含むIMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、抗GM2鎖ヒト型CDR移植抗体を生産する形質転換株を得た。親株のCHO/DG44細胞より得られた形質転換株をDG44/GM2株、FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞より得られた形質転換株をMs705/GM2株と名付けた。

【0268】

2. 培養上清中のヒトIgG抗体濃度の測定 (ELISA法)

ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体(American Qualex社製)をPhosphate Buffered Saline(以下、PBSと表記する)(インビトロジェン社製)で希釈して $1\mu\text{g/mL}$ とし、96穴のELISA用プレート(グライナー社製)に、 $50\mu\text{L}$ /ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、BSAを1%の濃度で含むPBS(以下、1%BSA-PBSと表記する)(和光純薬社製)を $100\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清、または培養上清から精製した抗体の各種希釈溶液を $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween20を0.05%の濃度で含むPBS(以下、Tween-PBSと表記する)(和光純薬社製)で各ウェルを洗浄後、1%BSA-PBSで200倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液(American Qualex社製)を二次抗体溶液として、それぞれ $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム(和光純薬社製)の0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素(和光純薬社製)を $1\mu\text{L/mL}$ で添加した溶液]を $50\mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、415nmの吸光度(以下、OD415と表記する)を測定した。

【0269】

3. 抗ガングリオシドGM2ヒト型CDR移植抗体組成物の精製

実施例2の1項で得られた形質転換細胞株DG44/GM2株およびMs705/GM2株を用いて、それ

ぞれが生産する抗ガングリオシドGM2ヒト型CDR移植抗体組成物を以下のようにして精製した。

各々の形質転換株を、G418を500 μ g/mLの濃度で含むIMDM-dFBS(10)に懸濁し、30mLを18 2cm² フラスコ（グライナー社製）に播種して5%CO₂ インキュベーター内で37℃、数日間培養した。細胞密度がコンフルエントになった時点で培養上清を除去し、25mLのPBSで細胞を洗浄後、EXCELL301培地（JRH Biosciences社製）30mLを注入した。5%CO₂ インキュベーター内で37℃、7日間培養後、細胞懸濁液を回収し、3000rpm、4℃の条件で5分間の遠心分離を行って上清を回収した後、0.22 μ m孔径 Millex GV フィルター（ミリポア社製）を用いて濾過滅菌した。上述の方法により取得した培養上清より、Mab Select（Amersham Biosciences社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗ガングリオシドGM2ヒト型CDR移植抗体組成物を精製した。精製した抗ガングリオシドGM2ヒト型CDR移植抗体組成物は、DG44/GM2株より得られた抗体組成物をDG44/GM2抗体、Ms705/GM2株より得られた抗体組成物をMs705/GM2抗体と名付けた。

【実施例3】

【0270】

FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞が生産する抗ガングリオシドGM2ヒト型CDR移植抗体組成物の生物活性

1. 抗ガングリオシドGM2ヒト型CDR移植抗体組成物のガングリオシドGM2に対する結合活性（ELISA法）

実施例2の3項で精製したDG44/GM2抗体およびMs705/GM2抗体のガングリオシドGM2に対する結合活性を、以下のようにして測定した。

【0271】

57.5ngのガングリオシドGM2（シグマ社製）を10ngのフォスファチジルコリン（シグマ社製）と5ngのコレステロール（シグマ社製）とを含む2mLのエタノール溶液に溶解した。この溶液20 μ Lを96穴のELISA用プレート（グライナー社製）の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%BSA-PBS溶液を100 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、実施例2の3項で調製したDG44/GM2抗体またはMs705/GM2抗体の各種希釈溶液を50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで各ウェルを洗浄後、1%BSA-PBS溶液で2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液（American Qualex社製）を二次抗体溶液として50 μ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液を50 μ L/ウェルで加えて発色させ、OD415を測定した。

図5には、DG44/GM2抗体およびMs705/GM2抗体のガングリオシドGM2に対する結合活性を示した。両抗体はガングリオシドGM2に対して同等の結合活性を有していた。

【0272】

2. 抗ガングリオシドGM2ヒト型CDR移植抗体組成物のin vitro細胞傷害活性（ADCC活性）

実施例2の3項で得られたDG44/GM2抗体およびMs705/GM2抗体のin vitro細胞傷害活性を以下のようにして測定した。

(1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FCS(10) 培地 [10%FCSを含むRPMI1640培地(インビトロジェン社製)] で培養したヒト肺小細胞癌株SBC-3細胞（JCRB 0818）を、遠心分離操作及び懸濁によりRPMI1640-FCS(5)培地 [5%FCSを含むRPMI1640培地(インビトロジェン社製)] で洗浄した後、RPMI1640-FCS(5) 培地によって、 2×10^5 細胞/mLに調製し、標的細胞溶液とした。

(2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血50mLを採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）0.5mLを加え穏やかに混ぜた。これをLymphoprep（AXIS SHIELD社製）を用いて、添付の使用説明書に従い単核球層を分離した。RPMI1640-FCS(5) 培地で3回遠心分離して洗浄後、同培地を用いて 5×10^6 細胞/mLの濃度で懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

【0273】

(3) ADCC活性の測定

96ウェルU字底プレート (Falcon社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の $50\mu\text{L}$ (1×10^4 細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を $50\mu\text{L}$ (2.5×10^5 細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は25:1となる) 添加した。更に、各種抗GM2ヒト型CDR移植抗体を各最終濃度0.1~1000ng/mLとなるように加えて全量を $150\mu\text{L}$ とし、 37°C で4時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を、CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega社製) を用いて、添付の説明書にしたがって吸光度データを取得することで測定した。標的細胞自然遊離の吸光度データは、エフェクター細胞溶液および抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、また、エフェクター細胞自然遊離の吸光度データは、標的細胞溶液および抗体溶液の代わりに培地のみを用いて、上記と同様の操作を行うことで取得した。標的細胞全遊離の吸光度データは、抗体溶液、エフェクター細胞溶液の代わりに培地を用い、反応終了45分前に $15\mu\text{L}$ の9% Triton X-100溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清のLDH活性を測定することにより求めた。ADCC活性は次式により求めた。

【0274】

【数1】

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = \frac{[\text{検体の吸光度}] - [\text{エフェクター細胞自然遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}]}{[\text{標的細胞全遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}]} \times 100$$

【0275】

図6には、DG44/GM2抗体およびMs705/GM2抗体のヒト肺小細胞癌株SBC-3細胞に対する細胞傷害活性を示した。Ms705/GM2抗体はいずれの抗体濃度においてもDG44/GM2抗体よりも高いADCC活性を示し、最高細胞傷害活性値も高い値を示した。

【実施例4】

【0276】

FUT8遺伝子ダブルノックアウト細胞が生産する抗GM2ヒト型CDR移植抗体組成物の単糖組成分析

実施例1の3項で精製したDG44/GM2抗体およびMs705/GM2抗体の中性糖・アミノ糖組成分析を、以下の様にして行った。

抗体を遠心濃縮機で減圧下乾固した後、2.0~4.0mMのトリフルオロ酢酸溶液を加えて 100°C 、2~4時間酸加水分解を行い、タンパク質から中性糖・アミノ糖を遊離した。トリフルオロ酢酸溶液を遠心濃縮機で除去し、脱イオン水に再溶解してDionex社製糖分析装置 (DX-500) を用いて分析を行った。CarboPac PA-1カラム、CarboPac PA-1ガードカラム (Dionex社製) を用い、溶離液として10~20mM水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液、洗浄液として500mM水酸化ナトリウム-脱イオン水溶解液を使用して、表1に示した溶出プログラムで分析した。

【0277】

【表 1】

中性糖・アミノ糖組成分析の溶出プログラム

時間 (分)	0	35	35.1	45	45.1	58
溶離液 (%)	100	100	0	0	100	100
洗浄液 (%)	0	0	100	100	0	0

得られた溶出プロファイルの中性糖・アミノ糖成分のピーク面積から、N-アセチルグルコサミン比を4とした場合の各成分（フコース、ガラクトース、マンノース）の組成比を算出した。

【0278】

表2に各抗体の単糖組成比により計算される、全N-グリコシド結合複合型糖鎖に占める、糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を示した。DG44/GM2抗体ではフコースが結合していない糖鎖の割合が4%であった。一方、Ms705/GM2抗体ではフコースのピークは検出限界以下であったことから、フコースが結合していない糖鎖の割合はほぼ100%と見積もられた。

以上の結果より、Ms705/GM2抗体のN-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンには、フコースが結合していないことが示された。

【0279】

(表2)

抗体名	抗GM2ヒト型CDR移植抗体組成物のフコース非含有糖鎖の割合 フコースを含まない糖鎖率 (%)
DG44/GM2抗体	4%
Ms705/GM2抗体	~100%

【図面の簡単な説明】

【0280】

【図1】図1は、プラスミドpKOFUT8Neoの構築を示した図である。

【図2】図2は、CHO/DG44細胞のFUT8対立遺伝子を1コピー破壊したヘミノックアウトクローンのゲノムサザンの解析結果を示した図である。レーンは左からそれぞれ分子量マーカー、ヘミノックアウトクローン50-10-104および親株であるCHO/DG44細胞のゲノムサザンである。

【図3】図3は、CHO/DG44細胞のFUT8両対立遺伝子を破壊したダブルノックアウトクローンWK704のゲノムサザン解析結果を示した図である。矢印は、相同組換えが起こった際に検出される陽性断片の検出位置を示す。

【図4】図4は、CHO/DG44細胞のFUT8両対立遺伝子を破壊したダブルノックアウトクローンより薬剤耐性遺伝子を除去したクローンのゲノムサザン解析結果を示した図である。レーンは左からそれぞれ分子量マーカー、ダブルノックアウトクローンの薬剤耐性遺伝子除去クローン4-5-C3、ダブルノックアウトクローンWK704、ヘミノックアウトクローン50-10-104および親株であるCHO/DG44細胞のゲノムサザンである。

【図5】図5は、精製したMs705/GM2抗体およびDG44/GM2抗体のガングリオシドGM2に対するELISA法における反応性を、抗体濃度を変化させて測定した図である。横軸

に抗体濃度を、縦軸に各抗体濃度における吸光度を示す。□が^sDG44/ GM2抗体、■が^sM
s705/ GM2抗体をそれぞれ示す。

【図 6】 図 6 は、精製した^sM705/ GM2抗体および^sDG44/ GM2抗体のヒト小細胞性肺癌
株SBC-3細胞に対するADCC活性を、抗体濃度を变化させて測定した図である。横軸に
抗体濃度を、縦軸に各抗体濃度における細胞傷害活性を示す。●が^sDG44/ GM2抗体、
○が^sM705/ GM2抗体をそれぞれ示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Ganglioside GM2-specific antibody composition

<130>

<160> 43

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1504

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1119)

<400> 1

atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac	48
Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp	
1 5 10 15	
ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc	96
Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr	
20 25 30	
ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac	144
Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr	
35 40 45	
gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga	192
Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg	
50 55 60	
att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg	240
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met	
65 70 75 80	
aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc	288
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile	
85 90 95	
atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc	336
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser	
100 105 110	

cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat	384
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp	
115 120 125	
gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt	432
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu	
130 135 140	
ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga	480
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly	
145 150 155 160	
aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg	528
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg	
165 170 175	
tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac	576
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn	
180 185 190	
ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat	624
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn	
195 200 205	
cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc	672
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser	
210 215 220	
cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg	720
Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu	
225 230 235 240	
gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc	768
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val	
245 250 255	
gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc	816
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val	
260 265 270	
ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca	864
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser	
275 280 285	
ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat	912
Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn	
290 295 300	
gaa gtg ggc aga tgt aaa gag acc ggc aaa att cat gtg act gtg gat	960

Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
 305 310 315 320
 ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc 1008
 Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
 325 330 335
 tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac 1056
 Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
 340 345 350
 gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc 1104
 Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
 355 360 365
 aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaattc gcgagacatg gactatgggtg 1159
 Asn Pro Asn Ala
 370
 cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagaccat cgaccataaa ccctcgactg 1219
 cctgtgtcgt cccacagct aagagctggg ccacagggttt gtgggcacca ggacggggac 1279
 actccagagc taaggccact tcgcttttgt caaaggctcc tctcaatgat tttgggaaat 1339
 caagaagttt aaaatcacat actcatttta cttgaaatta tgtcactaga caacttaaata 1399
 ttttgagtct tgagattgtt tttctctttt cttattaaat gatctttcta tgaccagca 1459
 aaaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1504

<210> 2
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> Cricetulus griseus

<400> 2
 Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
 1 5 10 15
 Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
 20 25 30
 Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
 35 40 45
 Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
 50 55 60
 Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
 65 70 75 80
 Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
 85 90 95

Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
100 105 110

His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
115 120 125

Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
130 135 140

Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
145 150 155 160

Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
165 170 175

Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
180 185 190

Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
195 200 205

His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
210 215 220

Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
225 230 235 240

Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
245 250 255

Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
260 265 270

Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
275 280 285

Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
290 295 300

Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
305 310 315 320

Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
325 330 335

Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
340 345 350

Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr

355

360

365

Asn Pro Asn Ala
370

<210> 3
<211> 1316
<212> DNA
<213> *Cricetulus griseus*

<400> 3
gccccgcccc ctccacctgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60
tggactggtg gaacctgcg caggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120
gacctaagt acagggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtcgcaga 180
tggcgctggc ttacccggag aggaatgggt gtttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240
ggatgcagca caaacccaag ccctgttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300
tgctgcaatg gtaggaggcc tttccggaa tatcaaatac aacttggatt tctggaggaa 360
gaatgtgcac atcaatgaca acgtcctgca ctcagctttc gaggtgggca ctcgcaaggt 420
ggtctcctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480
aatgatccac aatgggtccac cccacagcag caattttggg tactcgtatg ccaagaggat 540
gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcaccttca ctgctgtcat 600
ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa cttcaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660
tggcctcatc cataagggtg atctggccaa gagtaatggt tcagccttga ctgtttgggg 720
tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctcactggac ctagcccggc tcttcatctg 780
ggtcctgcgg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggcg aggaagatga 840
agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaagt 900
cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960
tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020
tgcttggttc accgacaact atgagcaggc ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080
tcagctggca atgcccagtc agtaggctgc agtctcatca tttgcttgc aagaactgag 1140

gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccagggggct tcatgcagcc 1200
 atccagtagg gcccattgtt gtccatcctc gggggaaggc cagaccaaca ccttgtttgt 1260
 ctgcttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggctctg ctgtcccttg tctaga 1316

<210> 4
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 4

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
 20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
 35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
 50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
 65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
 85 90 95

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
 100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
 115 120 125

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
 130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
 145 150 155 160

His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
 165 170 175

His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
 180 185 190

His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp

195

200

205

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
 210 215 220

Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
 225 230 235 240

Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
 245 250 255

Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp
 260 265 270

Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
 275 280 285

Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
 290 295 300

Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
 305 310 315 320

Lys

<210> 5

<211> 2008

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 5

aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatggt tccaattctt 60
 tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120
 tggcggttga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggg 180
 catttggttc gagataatga ccaccctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240
 gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300
 cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgttttagaa 360
 gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420
 ctgggaaagg atcatgaaat ctttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480
 ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540

catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660
acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720
agaaagctgg tatgtaatat caacaaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttggg atctcagaat 840
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgttttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900
gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aaatgttcaa 960
gtggctgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggct 1020
gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgacccctgc agtgtgggtg 1080
gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140
gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacat ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200
gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggt acacgttgaa 1260
gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320
actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaatttatt 1380
agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440
cggggcgtga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500
tcatcccagg tctgtagggt tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560
gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620
attgcagttt atcctcacca acctcgaact aaagaggaaa tccccatgga acctggagat 1680
atcattgggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aagggtgtcaa cagaaaacta 1740
ggaaaaacag gcctgtaccc ttcctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800
cctacatatc ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860
gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920
gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980
gaagggtgc tgtgccctca agcccatg

2008

<210> 6
<211> 1728
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 6
atgcgggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctggggggacc 60
ttgttatattt atataggtgg tcatttggtt cgagataatg accaccctga tcaactccagc 120
agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcctaa aacagcaaaa tgaagacttg 180
aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240
ggaagagtcc gtgtttttaga agaacagctt gtttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300
aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360
aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420
gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480
aggcttatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540
gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600
cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660
ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcatgattg cttatggcac ccagcgaaca 720
ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactgggtg gatgggagac tgtgttttaga 780
cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggcctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840
gtaaatgaca aaaacattca agtggctcag ctccccattg tagacagcct ccacctcgg 900
cctccttact taccactggc tgttccagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960
ggtgaccctg cagtgtgggtg ggtgtcccag tttgtcaaat acttgattcg tccacaacct 1020
tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080
ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140
gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cacgcagaat gcaagtggat 1200
aaaaaaagag tatatctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260

tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320
 cggtacacag aaaattcact tcgggggtgtg atcctggata tacactttct ctcacaggct 1380
 gactttctag tgtgtacttt ttcatcccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440
 accctgcac ctagtcctc tgcgaacttc cattctttgg atgacatcta ctattttgga 1500
 ggccaaaatg cccacaatca gattgctgtt taccctcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560
 attccaatgg aacctggaga tatcattggg gtggctggaa accattggga tggttattct 1620
 aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680
 aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

<210> 7

<211> 575

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 7

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160
 Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175
 Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190
 Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
 195 200 205
 Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220
 His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255
 Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
 260 265 270
 Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val
 275 280 285
 Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300
 Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320
 Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335
 Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys
 340 345 350
 Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365
 Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380
 His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp
 385 390 395 400
 Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510

His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 8

<211> 575

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80
 Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95
 Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110
 Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125
 Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140
 Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160
 Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175
 Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190
 Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
 195 200 205
 Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220
 His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255
 Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
 260 265 270
 Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val
 275 280 285
 Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300
 Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320
 Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335

Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
 340 345 350

Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365

Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu
 405 410 415

Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430

Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445

Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
 500 505 510

His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn
 530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
 565 570 575

<210> 9

<211> 383

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 9

gttaactggg gctcttttaa accctgaatt ttcttaaate ccacactcca agagtgtggt 60
ttaaactgat ttttttaatg aatacctttt gaagaataga gcattgtctc atcatgcaaa 120
gcttctcagg gattcagcta gcatgttgaa gaaacataag ggtgttaa at tgttgtcac 180
aagtgtgaa taaatattga cgtagtcttc agctattcta tactggaagt agatgatatt 240
ctcattggaa attctgttag gaagtaaccc ttcttgtctt cttacctgca tagaatccca 300
ggatataaaa cttgtgcttg tcgcccttgc cattgtctct cactggtggc ctttattgca 360
tctcatatct gccttctctt tcc 383

<210> 10

<211> 504

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 10

taagaattcc tgtgcccagc tgtatgtgag gctctctgca ggtgtaggga tgtttctgct 60
ttctttctgc acatgcttca cagctgaagt cttttgggtg tgagattgac attcagatag 120
actaaagtga ctggacttgt tgggaaacat actgtatgca ttattgccgt tgcctccagg 180
tgaaattaac acctcattca ccaatccctg ttcattcaaaa ctttctaccc acatcacttt 240
aaatagaaat tagaccaat atgactcctt ttttcctaag ctgtttatag agattgtgct 320
ggagcagtga gcttttgtgt ttgtttgttt gttttgtaat tttcccatg aaaatttctc 300
taaactcaaa cctaagaggg aaaaaaaaaa aacagactta tatgtgccac acttgtaaaa 360
aaaaatcatg aaagatgtat atgatatttt taaacagttt gaatattaag atcacaattt 420
ctattttaaa aacaatcttg ttttacatat caatcaccca attcccttgc cttcccatcc 480
tccattccc cccactgatc cccc 504

<210> 11

<211> 120

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 11

atgaatgttc attctttggg tatatgccca agagtagaat tgctaaatat tgaggtagac 60

tgattcccat tttcttgagg agtcgccata ttgatttcca aagtgactgt acaagttaac 120

<210> 12

<211> 274

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 12

aggcactagg taaatatattt tgaagaaaga atgagtatct cctatttcag aaaaactttt 60

attgacttaa atttaggata tcagaattag aaaacagtaa aaatttatag gagagttttt 120

aatgaatgtt attttaaggt tccatacaaa tagtaattaa aacttacaca aactatttgt 180

agtaatgatt cagtctggta taccctgatg agcattatac acttttaaatt tctttttgta 240

aattttttta ttagttcaaa ttaggaacaa gctt 274

<210> 13

<211> 9196

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 13

tctagaccag gctgggtctg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgtctg 60

ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tatttttgaa tattgtgata 120

atttacatta taattgtaag taaaaatttt cagcctatatt tgttatacat ttttgcgtaa 180

attattcttt ttgaaagtt ttgtgtcca taatagtcta gggaaacata aagttataat 240

ttttgtctat gtatttgcac atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300

ggtatgtaat agcttcaaca tgtggatatga tagaattttt cagtgtata taagttgtta 360

cagcaaagtg ttattaattc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420

atccttaagc tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagcccaaaa tctgttcatt 480

ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540

ggtccaagaa tggagttagg taaggggaat tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600

gatgagtctt gtgaccttag tttcttttaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660

ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720
tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca ttttttttt gccacatgca gcttgcctt 780
atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840
aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900
cccaccacct ccagagtggg aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960
aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020
cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080
agtagacaag acattaaata ttccttggga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaaata 1140
atagtcagtg agtatacccc tccccattc tatatttttag cagaaatcag aataaatggt 1200
gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttctttg ggtttttgtg catttaaagt 1260
caataaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga ttttgggaat cccctttctt 1320
cagcttttct atttaatctc ttaatgataa ttttaattgt ggccatgtgg tcaaagtata 1380
tagccttgta tatgtaaatg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440
tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500
tttcatatat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatac 1560
tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620
tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgttgtaa gccttctttt ggaattttta 1680
ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttcc atatatgtat ataatatatt 1740
tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaatat atttgaaaaa ataatggtct 1800
ggtttgatcc atttgaacct tttgatgttt ggtgtgggtg ccaattggtt gatggttatg 1860
ataacctttg cttctctaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920
gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980
ttcacttata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatattagc ctgaagtaca 2040
tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggtatta 2100
cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160

aggtagaacc ctaacgtgtg tgggtgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220
agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280
ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340
gcacaggaca agaaagctgc ctccttgtat caccaggaaag atctttttgt aagagtcac 2400
acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460
attttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520
aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttcct ggcgttggat 2580
tatgctcatt ctttttgctt gggggacctt attgttttat ataggtggtc atttggttcg 2640
agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700
gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc ggtaggtttg 2760
aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgaccttt aggtataggg tctcagtctg 2820
ctgttgaaaa atataatttc tacaaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat ttagcagac 2880
tttttaaag tcagtgatac atctatatag tcaatatagg ttacatagt tgcaatctta 2940
ttttgcatat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000
attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgctcatt aaatTTTTT 3060
attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120
tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtgca tccggaatgt gggtaattat 3180
tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcac cagttgtttg 3240
gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300
ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360
tctaagaatg atcatgtgta cagtgttac tgtcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420
tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtgggtatta 3480
agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540
tagagaggat gccttctggc tctccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600
cttttagaac tcagatgttt catatgggtat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660

aaatgtctat ggatgataat gttgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720
tcctcgggtgt gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780
agtcagggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840
cagggagggt tatgaaagtt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattcct 3900
gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaattt 3960
gtcatgggcc agacagcgtg ttttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtag 4020
tgttttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080
aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140
tccgaactct tatcttccta agctgaaaac agaaaaagca atgaccacaga aaattttatt 4200
taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc ttttccttt tataatttag 4260
gtcctgaat aatcactgaa ttttctccat gttccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320
tccttttttc ttaccacaaa gtatcttggt tttgctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380
aatgtgaaat tctctgtccc tgcaggggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440
agaggctgta ttaattatga aactgttggg cagttggcta gggcttctta ttggctagct 4500
ctgtcttaat tattaacaca taactactat tgtaagtatt tccatgtggg cttatcttac 4560
caaggaaagg gtccagggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtgaa gaggagagag 4620
cgatttccta tttgtctctg cttattttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680
ggccaatcag ccaatcagtg ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740
gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtag cttttaatac 4800
taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860
ttgtgctcat aagtagcatg gtagtcagaa gagggaaatca gatctttttt taagggacaa 4920
agagttttatt cagattacat ttaaggtga taatgtatga ttgcaagggt atcaacatgg 4980
cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040
gatgcatgca ttctgtgtct cagctcactt ttcttgagc tgagctgatt gtaagccatc 5100

tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160
catctctcca gtccctcata tgggtctctta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220
aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaagc tgatataata 5280
aatgtaaata caatctagaa catTTTTata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340
gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400
tagtaatgct gtttgtacac catccacagg ggttttattt taaagctaag acatgaatga 5460
tggacatgct tgttagcatt tagacttttt tccttactat aattgagcta gtatttttgt 5520
gctcagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggtaatttc tttgtgataa 5580
aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagttttta agattcagaa 5640
caataatttt caaaagcagt tacccaactt tccaaataca atctgcagtt ttcttgatat 5700
gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctatttactc ttgatttttt 5760
tttcaaattt aggctagttc actagttgtg tgtaaggtta tggctgcaa catctttgac 5820
tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttggcca aaatcttggt ccattctggg 5880
tttcttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaagggtg ggtagtattg gaaggctctc 5940
aggatatata ttctatattc tgtatttttt tcctctgtca tatatttgct ttctgtttta 6000
ttgatttcta ctgttagttt gatacttact ttcttacct ttctttggga tttattttgc 6060
tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120
atagactgaa tgcccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180
ttttttaata ttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240
gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaaa ttaatttgtg 6300
ttctatattt ttigacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360
atttttttgt ttgatctggt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420
tgaatgttgt gctgttactt atctttatta ttatttttgc ttattttcta gccaaatgaa 6480
attatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgccttttgt 6540
tggatgaatgc ttaagaaaaa cgtgtgggtc actgatattg gttctaattc tatatagcat 6600

gttgtttggt aggtagttga ttatgctggg cagattgtct tgagtttatg caaatgtaaa 6660
atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaaagtatg ctgctgtct cctatcgggt 6720
ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaatactaac tccgtactat 6780
cttgttttct gtgaattaac cccttttcaa aggtttcttt tctttttttt ttttaaggac 6840
aacaagttaa ttacagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900
ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gagtcaagag cagagagcag 6960
tgaattaatg catgcattcc tgtgggcagc tcacttttcc tattcttaga tagtctagga 7020
tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcatatc cacttacttc agttcatgca 7080
atcaaccaag gcacatccac aggaaaaact gatthagaca acctctcatt gagactcttc 7140
ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200
gtaaatataa tgaaaatgtt gattatcacc ataattcatc tgtatccctt tgttattgta 7260
gattttgtga agttcctatt caagtccttg ttccttcctt aaaaacctgt ttttagtta 7320
aataggtttt ttagtgttcc tgtctgtaaa tactttttta aagttagata ttattttcaa 7380
gtatgttctc ccagtctttg gcttgtattt tcatcccttc aatacatata tttttgtaat 7440
ttattttttt tatttaaatt agaaacaaag ctgcttttac atgtcagtct cagttccctc 7500
tccctccctt cctccctgc tccccaccta agccccaatt ccaactcctt tcttctccc 7560
aggaagggtg aggccctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgtcatatca tttggagcag 7620
ggcctagacc ctccccagtg tgtctaggct gagagagtat ccctctatgt ggagagggt 7680
cccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740

tgtccggacc tccaaactga ctctctcctt caggaggtct ggaacagttc tatgctgggt 7800
tcccagatat cagtctgggg tccatgagca accccttggt caggtcagtt gtttctgtag 7860
gtttccccag cccggtcttg accccttgc tcatcacttc tccctctctg caactggatt 7920
ccagagttca gctcagtgtt tagctgtggg tgtctgcac tgcttccatc agctactgga 7980
tgagggtctt aggatggcat ataaggtagt catcagtctc attatcagag aagggtttt 8040
aaggtagcct cttgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100

acagtgcacag aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtggtggta tcccttttct 8160
tgctctcatc cgttcctccc ctgactagat ctctctgctc cctcatgtcc tcctctcccc 8220
tccccctctc cccttctctt tcttctaact ccctctcccc tccaccacag atccccatta 8280
gcttatgaga tcttgtcctt attttagcaa aacctttttg gctataaaat taattaattt 8340
aatatgctta tatcaggttt attttggcta gtatttgtat gtgtttgggt agtgttttta 8400
accttaattg acatgtatcc ttatattag acacagattt aaatatitga agtttttttt 8460
tttttttttt ttaaagattt atttattttt tatgtcttct gcctgcatgc cagaagaggg 8520
caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaactcag 8580
gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640
gtttctttta aagaggatag cagtgcata tttttccctt tgaccaatga ctcctacctt 8700
actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttctc 8760
ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcatc tcttattttt gtctgttgga ttatataggc 8820
ttttattttt ctgtttttac agtaagtta atcaaattaa aattatttta tggaaatgggt 8880
gtgttgacta catgtatgtc tgtgcacat gtgctgacct ggtcttggcc agaagaaggt 8940
gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000
aaaccccagc tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtcc tctcttcaag 9060
caggatgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgtatc tctagcacc 9120
atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag cattgtgtga cagagacagg 9180
aggatcccaa gagctc 9196

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Asn Tyr Asn Met Asp

1

5

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 15
Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 16
Thr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 17
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 18
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 19
Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 20
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 20
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 21
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 21
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50

55

60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 22

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

<210> 23

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

<210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 24

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 25
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 25
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 26
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

<210> 27

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

115

120

125

<210> 28
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

<210> 29
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 29
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

<210> 30

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Tyr Gly His Tyr Tyr Gly Tyr Met Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 31

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 32

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

出証特 2 0 0 4 - 3 1 0 2 4 8 1

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 34
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

<210> 35
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 35
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36

gagacttcag cccacttcaa ttattggc

28

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37

cttgtgtgac tcttaactct cagag

25

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 38

gaggccactt gtgtagcgcc aagtg

25

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

ccctcgagat aacttcgtat agc

23

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 40

ggtaggcctc actaactg

18

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 41

catagaaaca agtaacaaca gccag

25

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

gtgagtccat ggctgtcact g

21

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

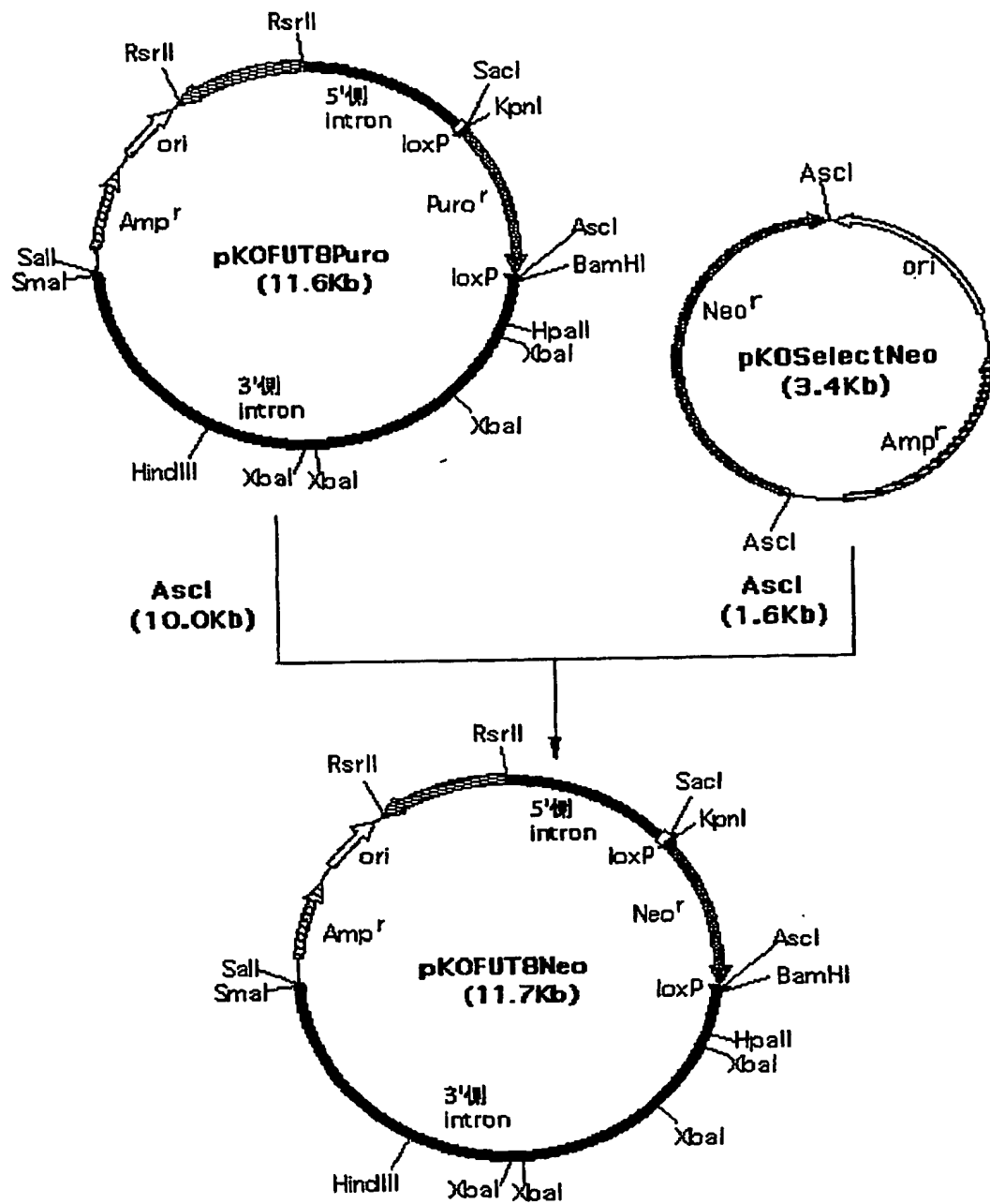
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 43

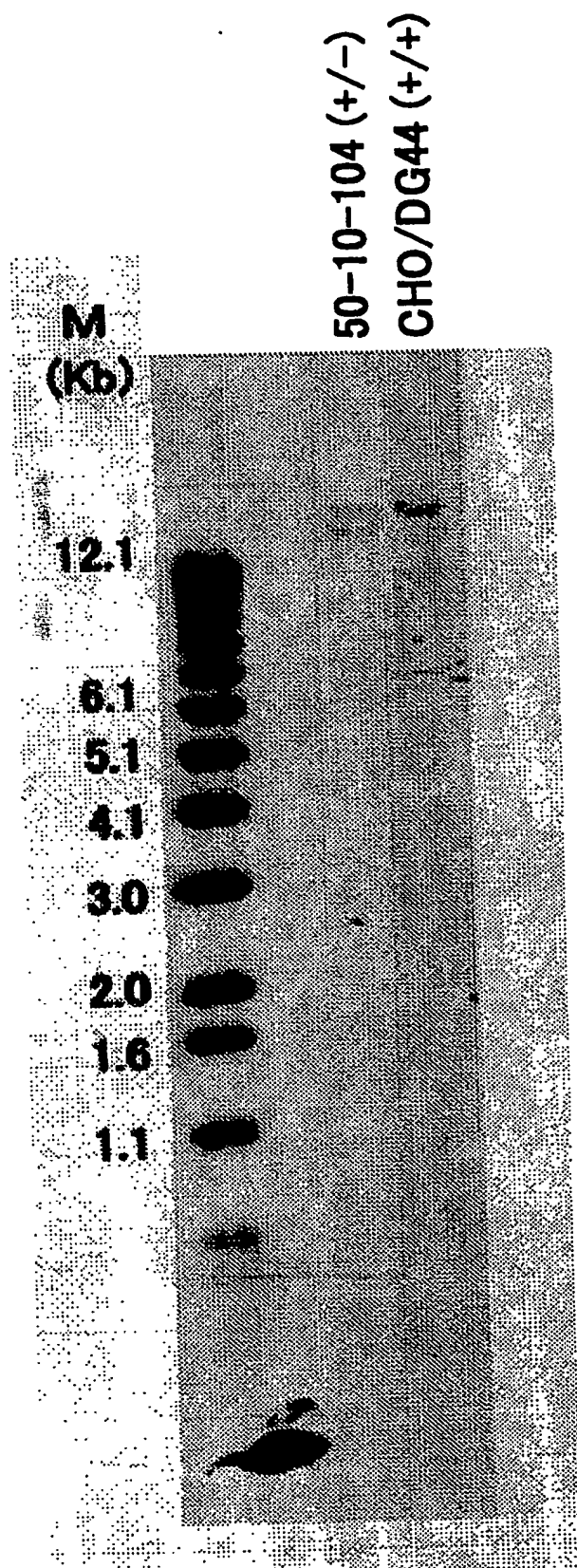
cctgacttgg ctattctcag

20

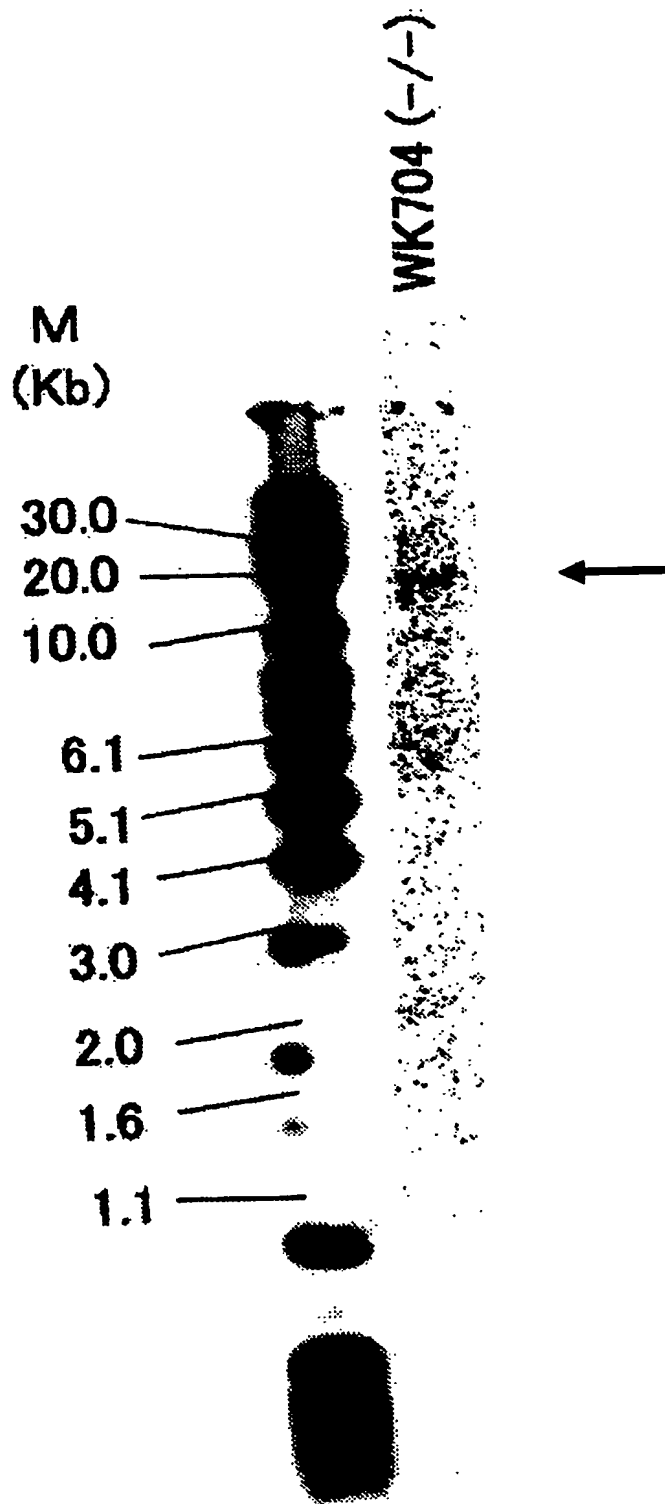
【書類名】図面
【図1】



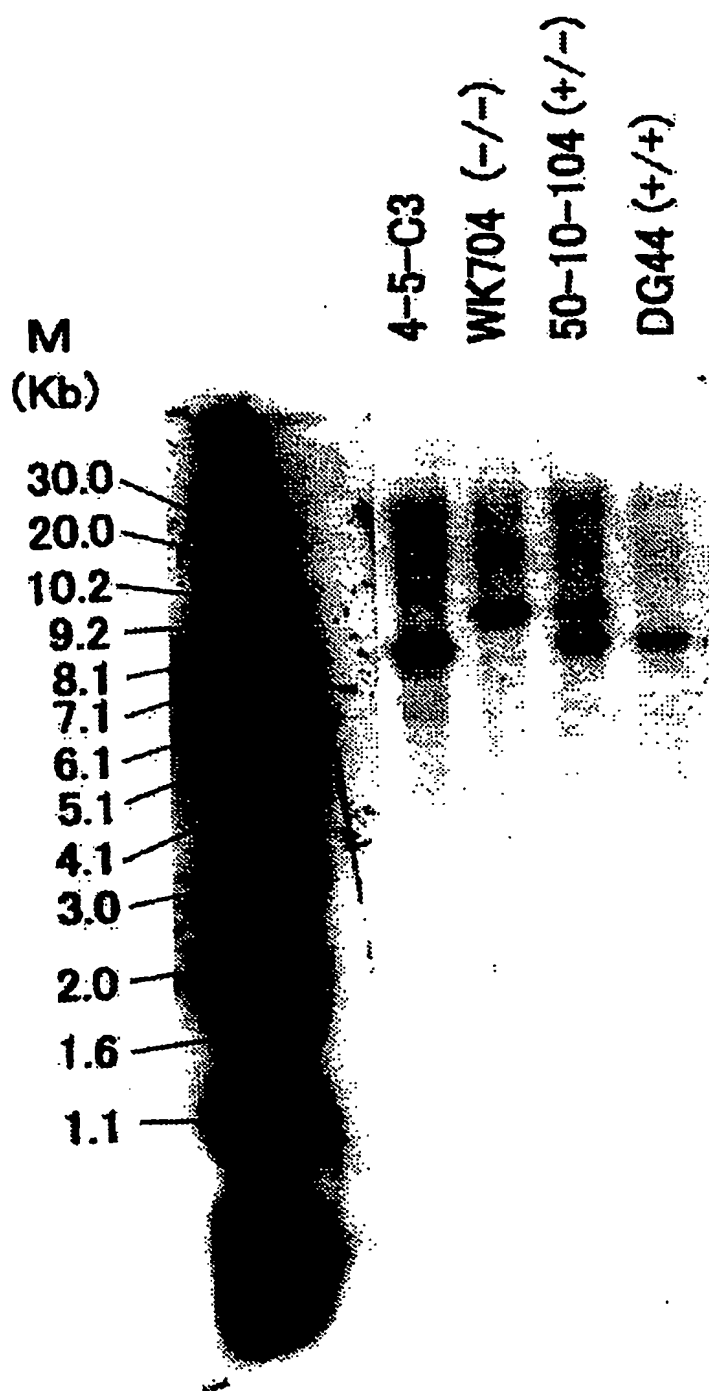
【図 2】



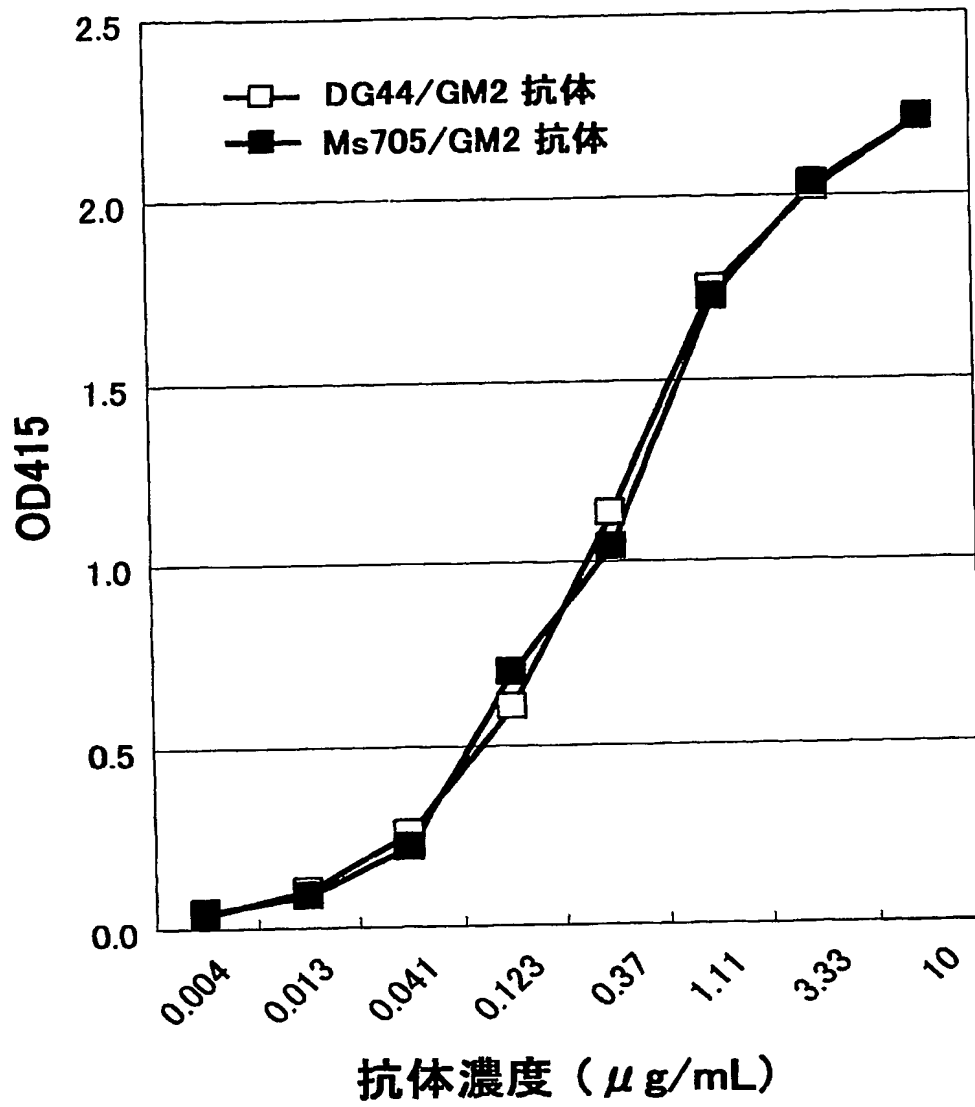
【図 3】



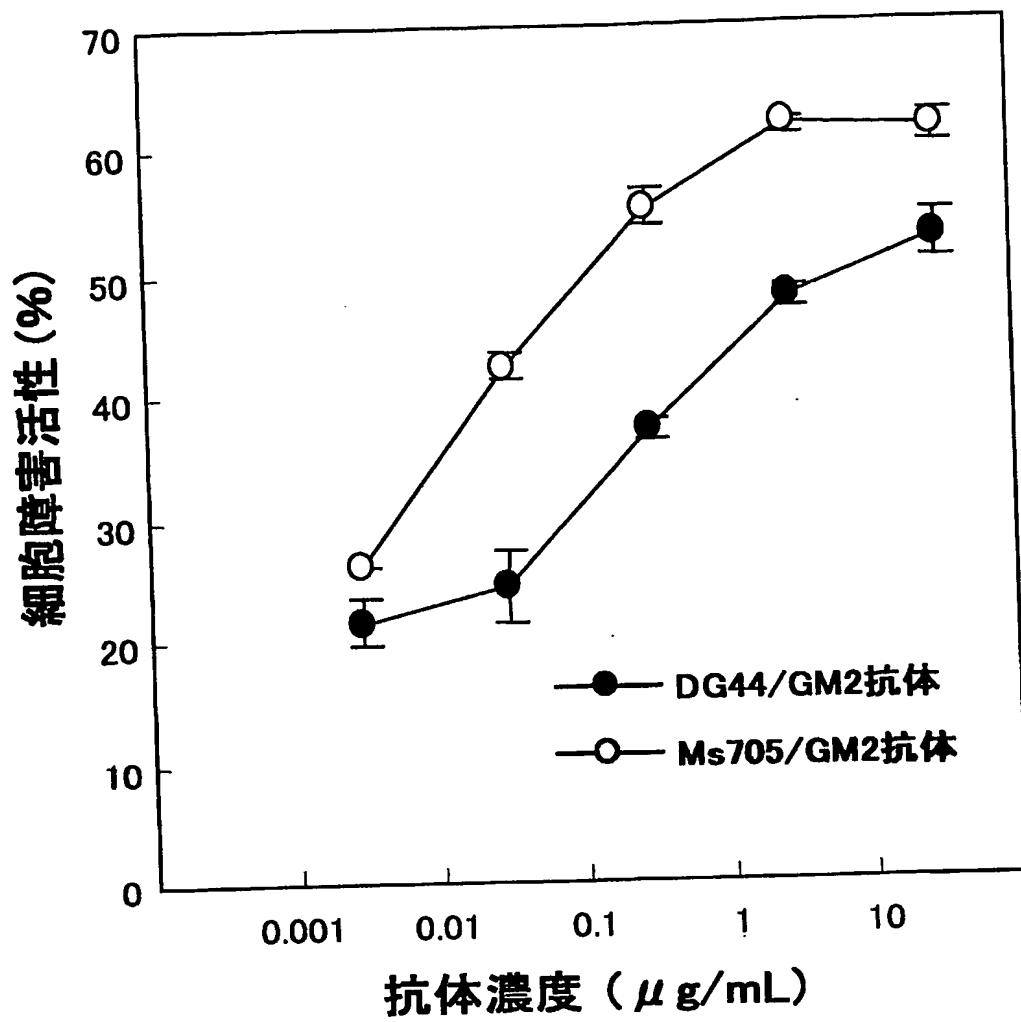
【図 4】



【図 5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 エフェクター機能が增強された医薬品として有用な抗ガングリオシドGM2抗体組成物が求められている。

【解決手段】 ガングリオシドGM2に特異的に結合し、N-グリコシド結合複合型糖鎖をFc領域に有する抗体分子からなる組成物であって、N-グリコシド結合複合型糖鎖が該糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖である抗体組成物、該抗体組成物を生産する形質転換体、該抗体組成物の製造方法および該抗体組成物を含有する医薬を提供する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 1 2 9 4 3 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 0 2 9]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号

氏 名

協和醗酵工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.